

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**PENTOKSİFİLİN VE ALFA LİPOİK ASİTİN METOTREKSAT
ARACILI KARACİĞER VE BÖBREK HASARLARI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. İlkey ARMAĞAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Dilek BAYRAM

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim
Birimi tarafından 3696-TU2-13 Proje numarası ile desteklenmiştir.**

ISPARTA - 2014

ÖNSÖZ

Tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve her türlü desteğini esirgemeyen tez danışmanın Yrd. Doç. Dr. Dilek BAYRAM'a,

Histoloji ve Embriyoloji uzmanı olarak yetişmemde büyük emeği geçen değerli hocam ve bölüm başkanımız Prof. Dr. Meral ÖNCÜ'ye,

Tez konumun belirlenmesinde bana ışık tutan Yrd. Doç. Dr. Halil AŞÇI'ya,

Bize laboratuvarını açan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nurten ÖZÇELİK'e,

Uzmanlık tezimdeki destek ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Efkan UZ'a, Çalışmamım laboratuvar kısmında büyük emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Ayşe YİĞİT'e,

Biyokimya çalışmalarında emeği geçen Uzm. Dr. Erdal ÇELİK'e,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarım, Arş. Gör. Hakan DARICI, Arş. Gör. İ. Aydın CANDAN, Arş. Gör. Meltem ÖZGÖÇMEN, Arş. Gör. Dr. Murat SEVİMLİ'ye

Projemizi destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimine,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hep yanımda hissettiğim aileme,

Çalışmalarım sırasında hep yanımda olan sevgili eşim ve hayat arkadaşım Yrd. Doç. Dr. H. Hakan ARMAĞAN'a

Bu zor günlerde bana yorgunluğumu unutturan minik neşe kaynağım oğlum Ali Kerem'e sonsuz teşekkürler.

Dr. İlkay ARMAĞAN

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
GRAFİKLER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Karaciğer Histolojisi	3
2.2. Böbrek Histolojisi	6
2.3. Metotreksat.....	9
2.3.1. Kimyasal Yapısı	9
2.3.2. Farmakodinamik Özellikleri	9
2.3.3. Farmakokinetik Özellikleri	11
2.3.4. Endikasyonları	12
2.3.5. Yan Etkiler	13
2.3.5.1. Metotreksatın Hepatotoksitesi	15
2.3.5.2. Metotreksatın Nefrotoksitesi	16
2.4. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Savunma Mekanizmaları.....	17
2.5. Metotreksat Toksisitesi ve Oksidatif Stres.....	21
2.6. Pentoksifilin (Okspentifilin).....	21
2.7. Alfa Lipoik Asit	23
3. MATERYAL ve METOD	25
3.1. Materyal	25
3.1.1. Deney Hayvanları	25
3.1.2. Kullanılan İlaçlar.....	25
3.1.3. Kullanılan Malzemeler ve Aletler.....	26
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.2. Metod	28
3.2.1. Deneysel Model	28

3.2.2. Anestezi, Doku ve Kan Örnekleri	29
3.2.3. Kan Örneklerinde Biyokimyasal Analizler	30
3.2.4. Doku Örneklerinde Biyokimyasal Analizler	30
3.2.4.1. Numunelerinin Korunması, Homojenizasyonu ve Deney için Hazırlanması	30
3.2.4.2. Numunelerde Protein Tayini	31
3.2.4.3. Myeloperoksidaz Enzim Aktivitesinin Tayini	31
3.2.4.4. Malondialdehit Miktarının Tayini	32
3.2.4.5. Nitrik Oksit Miktarının Tayini	32
3.2.4.6. Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayini	33
3.2.4.7. Ksantin Oksidaz Enzim Aktivitesinin Tayini	33
3.2.4.8. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Tayini	34
3.2.4.9. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Tayini	34
3.2.5. Doku Örneklerinde Histokimyasal Çalışmalar	35
3.2.5.1. Doku Takip Çalışmaları, Kesitlerin Elde Edilmesi, Rutin Boyanması	35
3.2.5.2. Değerlendirme	37
3.2.6. Doku Örneklerinde İmmünohistokimyasal Çalışmalar	37
3.2.6.1. Doku Takip Çalışmaları, Kesitlerin Elde Edilmesi	37
3.2.6.2. İmmünohistokimyasal Boyama	37
3.2.6.2.1. İmmünohistokimyasal Boyamada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı	37
3.2.6.2.2. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü	38
3.2.6.3. Değerlendirme	40
3.2.7. İstatistiksel Analizler	40
4. BULGULAR	42
4.1. Deney Sonunda Rat Sayısı	42
4.2. Kan Örneklerinde Biyokimyasal Bulgular	42
4.3. Doku Örneklerinde Biyokimyasal Bulgular	47
4.3.1. Karaciğer Doku Örneklerinde Biyokimyasal Bulgular	47
4.3.2. Böbrek Doku Örneklerinde Biyokimyasal Bulgular	53
4.4. Doku Örneklerindeki Histokimyasal Bulgular	59
4.4.1. Karaciğer Doku Örneklerindeki Histokimyasal Bulgular	59
4.4.2. Böbrek Doku Örneklerindeki Histokimyasal Bulgular	60
4.5. Doku Örneklerinde İmmünohistokimyasal Bulgular	71

4.5.1. Karaciğer Doku Örneklerinde İmmünohistokimyasal Bulgular	71
4.5.1.1. Karaciğer Doku Örneklerinde iNOS İmmünboyanma.....	71
4.5.1.2. Karaciğer Doku Örneklerinde TNF- α İmmünboyanma.....	74
4.5.2. Böbrek Doku Örneklerinde İmmünohistokimyasal Bulgular	78
4.5.2.1. Böbrek Doku Örneklerinde iNOS İmmünboyanma.....	78
4.5.2.2. Böbrek Doku Örneklerinde TNF- α İmmünboyanma.....	81
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	85
ÖZET.....	93
ABSTRACT	94
KAYNAKLAR	95

SİMGELER ve KISALTMALAR

·OH	: Hidroksil radikali
¹O₂	: Tekli (singlet) oksijen
1, 25 (OH₂) vit D3	: Aktif vitamin D3
ADA	: Adenozin deaminaz
ALA	: Alfa Lipoik Asit
ALP	: Alkalen Fosfataz
ALT	: Alanin Transaminaz
AST	: Aspartat Transaminaz
ATP	: Adenozin trifosfat
BUN	: Kan Üre Nitrojeni
Ca	: Kalsiyum
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
CAT	: Katalaz
cNOS	: Yapısal Nitrik Oksit Sentaz
Cr	: Kreatinin
CuCl₂	: Bakır klorür
Cu-Zn SOD	: Bakır-çinko süperoksit dismutaz
CYP	: Sitokrom p450
dATP	: Deoksi Adenozin Trifosfat
DBil	: Direk Bilirübin
DHF	: Dihidrofolat
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
DHLA	: Dihidrofolat Redüktaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EDTA	: Etilen diamin tetraasetik asit
eNOS	: Endotelial nitrik oksit sentaz
FA	: Folik Asit
Fe	: Demir
G6PDH	: Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
GGT	: Gama Glutamil Transferaz
GR	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Redükte glutasyon

GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
GSHR	: Glutatyon Redüktaz
GSSG	: Okside glutatyon
GST	: Glutatyon-S-Transferaz
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H-E	: Hemotoksilen Eosin
HNO₂	: Nitröz Oksit
HO₂[·]	: Perhidroksil radikali
HOCl	: Hipoklorik Asit
HRO₂-	: Hidroperoksil
IM	: İntramusküler
IL	: İnterlökin
iNOS	: Uyarılabilir nitrik oksit sentaz
ip	: İntraperitoneal
iv	: İntravenöz
JRA	: Juvenil Romatoid Artrit
KC	: Karaciğer
KH₂PO₄	: Potasyum dihidrojen fosfat
LA	: Lipoik Asit
LOO-	: Alkoksil
LOOH	: Lipit Hidroperoksit
MDA	: Malondialdehit
MPO	: Myeloperoksidaz
MTX	: Metotreksat
MTX- PGs	: Metotreksat poliglutamatları
NAD⁺	: Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NBT	: Nitroblue tetrazolium
nNOS	: Nöronal Nitrik Oksit Sentaz
NO	: Nitrik oksit
NO₂	: Nitrojen dioksit
NOS	: Nitrik oksit sentaz
NSAID	: Steroid Olmayan Antiinflamatuvar İlaç
O₂	: Moleküler oksijen

O₂⁻	: Süperoksit anyon radikali
ONOO⁻	: Peroksinitrit
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu
PTX	: Pentoksifilin
RA	: Romatoid Artrit
RNA	: Ribonükleik asit
RO₂-	: Peroksil
RONOO	: Alkil Peroksinitrat
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri (Radikalleri)
SAH	: S-adenozil homosistein
SF	: Serum Fizyolojik
SOD	: Süperoksit Dismutaz
SOR	: Serbest oksijen radikalleri
SSS	: Santral Sinir Sistemi
TBA	: Tiobarbitürik asit
TBil	: Total Bilirubin
TCA	: Trikloroasetik Asit
THF	: Tetrahidrofolat
TNF-α	: Tümör nekroz faktörü alfa
XO	: Ksantin oksidaz

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Deneyde gruplara uygulanan ilaçlar.....	29
Tablo 2. Rat Kan Örneklerinde AST, ALT, ALP, GGT enzim düzeyleri, TBil, DBil, BUN, Üre, Cr Düzeyleri.....	44
Tablo 3. Rat karaciğer doku örneklerinde Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutasyon Peroksidaz, Ksantin Oksidaz, Myeloperoksidaz enzim aktiviteleri, Malondialdehit ve Nitrik Oksit seviyeleri.....	49
Tablo 4. Rat böbrek doku örneklerinde Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutasyon Peroksidaz, Ksantin Oksidaz, Myeloperoksidaz enzim aktiviteleri, Malondialdehit ve Nitrik Oksit seviyeleri	55
Tablo 5. Kontrol ve deney gruplarında karaciğer dokusunda gözlenen yapısal değişiklikler ve Kruskal-Wallis p değerleri	61
Tablo 6. Gruplar arasında karaciğer dokusunda gözlenen yapısal değişikliklerin Mann-Whitney U testine göre p değerleri.....	62
Tablo 7. Kontrol ve deney gruplarında böbrek dokusunda gözlenen yapısal değişiklikler ve Kruskal-Wallis p değerleri	63
Tablo 8. Gruplar arasında böbrek dokusunda gözlenen yapısal değişikliklerin Mann-Whitney U Testine Göre p değerleri	64
Tablo 9. Karaciğer dokusunda gruplara göre ortalama iNOS immünboyanma dereceleri	71
Tablo 10. Karaciğer dokusunda gruplara göre ortalama TNF- α immünboyanma dereceleri	75
Tablo 11. Böbrek dokusunda gruplara göre ortalama iNOS immünboyanma dereceleri	78
Tablo 12. Böbrek dokusunda gruplara göre ortalama TNF- α immünboyanma dereceleri	82

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Klasik karaciğer lobülü, portal lobül ve karaciğer asinüsünün karşılaştırması	4
Şekil 2. Karaciğer asinüsü	5
Şekil 3. Metotreksat'ın moleküler yapısı.....	9
Şekil 4. Dihidrofolatın moleküler yapısı.....	9
Şekil 5. Folik asit metabolizması	10

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte	65
Resim 2. Metotreksat grubuna ait sıçan karaciğer dokusu.	65
Resim 3. Metotreksat grubuna ait sıçan karaciğer dokusu	66
Resim 4. Metotreksat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan karaciğer dokusu.....	66
Resim 5. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu	67
Resim 6. Metotreksat + Pentoksifilin + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu	67
Resim 7. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte	68
Resim 8. Metotreksat grubuna ait sıçan böbrek dokusu	68
Resim 9. Metotreksat grubuna ait sıçan böbrek dokusu	69
Resim 10. Metotreksat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan böbrek dokusu	69
Resim 11. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu	70
Resim 12. Metotreksat + Pentoksifilin+ Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu	70
Resim 13. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusu.....	72
Resim 14. Metotreksat grubuna ait sıçan karaciğer dokusu	72
Resim 15. Metotreksat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan karaciğer dokusu.....	73
Resim 16. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu	73
Resim 17. Metotreksat + Pentoksifilin + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu	74
Resim 18. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusu.....	75
Resim 19. Metotreksat grubuna ait sıçan karaciğer dokusu	76
Resim 20. Metotreksat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan karaciğer dokusu.....	76
Resim 21. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu	77
Resim 22. Metotreksat + Pentoksifilin + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu	77
Resim 23. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek dokusu.....	79
Resim 24. Metotreksat grubuna ait sıçan böbrek dokusu	79
Resim 25. Metotreksat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan böbrek dokusu	80
Resim 26. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu	80
Resim 27. Metotreksat + Pentoksifilin + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu	81

Resim 28. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek dokusu.....	82
Resim 29. Metotreksat grubuna ait sıçan böbrek dokusu	83
Resim 30. Metotreksat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan böbrek dokusu	83
Resim 31. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu	84
Resim 32. Metotreksat + Pentoksifilin + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu	84

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. Gruplara ait serum AST düzeylerinin karşılaştırılması	44
Grafik 2. Gruplara ait serum ALT düzeylerinin karşılaştırılması	45
Grafik 3. Gruplara ait serum ALP düzeylerinin karşılaştırılması	45
Grafik 4. Gruplara ait serum GGT düzeylerinin karşılaştırılması	45
Grafik 5. Gruplara ait serum TBil düzeylerinin karşılaştırılması	46
Grafik 6. Gruplara ait serum DBil düzeylerinin karşılaştırılması	46
Grafik 7. Gruplara ait serum BUN düzeylerinin karşılaştırılması	46
Grafik 8. Gruplara ait serum Üre düzeylerinin karşılaştırılması.....	47
Grafik 9. Gruplara ait serum Cr düzeylerinin karşılaştırılması.....	47
Grafik 10. Gruplara ait karaciğer dokusunun SOD aktivitelerinin karşılaştırılması.	50
Grafik 11. Gruplara ait karaciğer dokusunun CAT aktivitelerinin karşılaştırılması	50
Grafik 12. Gruplara ait karaciğer dokusunun GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması	51
Grafik 13. Gruplara ait karaciğer dokusunun MDA düzeylerinin karşılaştırılması..	51
Grafik 14. Gruplara ait karaciğer dokusunun NO düzeylerinin karşılaştırılması	52
Grafik 15. Gruplara ait karaciğer dokusunun XO aktivitelerinin karşılaştırılması...	52
Grafik 16. Gruplara ait karaciğer dokusunun MPO aktivitelerinin karşılaştırılması	53
Grafik 17. Gruplara ait böbrek dokusunun SOD aktivitelerinin karşılaştırılması	56
Grafik 18. Gruplara ait böbrek dokusunun CAT aktivitelerinin karşılaştırılması	56
Grafik 19. Gruplara ait böbrek dokusunun GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması	57
Grafik 20. Gruplara ait böbrek dokusunun MDA düzeylerinin karşılaştırılması	57
Grafik 21. Gruplara ait böbrek dokusunun NO düzeylerinin karşılaştırılması	58
Grafik 22. Gruplara ait böbrek dokusunun XO aktivitelerinin karşılaştırılması.....	58
Grafik 23. Gruplara ait böbrek dokusunun MPO aktivitelerinin karşılaştırılması....	59

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Metotreksat (MTX), bir antineoplastik ilaç grubu olan antimetabolitler grubundandır. Metotreksat'ın yüksek dozlarda birçok malignitede, düşük dozlarda ise otoimmün hastalıklarda terapötik ajan olarak geniş kullanım alanı vardır (1). MTX, bu geniş kullanım endikasyonlarına karşın, özellikle pnömoni, nefrotoksisite ve hepatotoksisite gibi bir dizi yan etkilerle karşımıza çıkar (2-4) ve bu reaksiyonlar nedeniyle, zaman zaman ilaç kullanımında kısıtlamalara gidilmiştir. Hepatotoksisite ve nefrotoksisite başta olmak üzere, gelişen bu yan etkilerden genellikle reaktif oksijen radikallerinin (ROS) meydana getirdiği oksidatif hasar sorumlu tutulmuştur (4-6). MTX kullanımı hücre içi Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADP(H)) seviyelerinin azalmasına sebep olabilir (7). Reaktif oksijen türlerine (ROS)'ne karşı önemli bir koruyucu ajan olarak bilinen redükte glutatyonun (GSH) seviyesini koruyan glutatyon redüktaz (GR) enzimi tarafından da NADPH kullanılır (8). Böylece, MTX kullanımına bağlı olarak düşen NADP seviyeleri, hepatositleri ROS'a (süperoksid anyonları ($O_2^{\cdot-}$) hidroksil radikalleri ($\cdot OH$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorid radikalleri gibi) karşı duyarlılaştıran glutatyon seviyelerinin düşmesine ve bu da hepatosit hasarına sebep olur (9). MTX'in en önemli yan etkilerinden birisi renal toksisitedir (10) ve renal toksisite mekanizmalarından birtanesi ROS geliştirmesine bağlıdır (11, 12). Bu nedenle MTX toksisitesinden korunmak için antioksidan ajanlarla birlikte kullanılması gerekliliği öne çıkmaktadır.

Pentoksifilin (PTX), siklik adenosin monofosfat (cAMP) fosfodiesterazının nonspesifik inhibitörü olarak bilinir. Klinik olarak yetersiz doku perfüzyonuyla ilişkili periferik vasküler ve serebrovasküler hastalıkların tedavisinde geniş kullanımı vardır (13). PTX, Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) sentezini (14, 15) ve TNF- α 'nın indüklediği makrofajik Nitrik Okisit (NO) sentezini (14, 16-19) bloke eder. Ayrıca $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 peroksit iyonlarının fazladan salınımını önler ve bu da PTX'in antioksidan aktivitesinin olduğunu gösterir (20).

Alfa lipoik asit (ALA), mitokondride oktanoik asit ve bir sülfür kaynağından sentezlenen (21) ve bazı yiyeceklerde doğal bir maddedir. Lipoik asit (LA)'ın etkileri arasında serbest radikalleri uzaklaştırmak ve antioksidan rejenerasyonu sayılmaktadır (22). LA'nın hücre içi ROS'ların pek çoğunun radikalik etkisini süpürerek oksidatif

stresle savaştığı pek çok çalışma ile gösterilmiş (23-25) ve ROS'ların radikal etkilerinin süpürülerek ortadan kaldırılması bir tarafa vitamin C, vitamin E ve GSH gibi diğer hücrel antioksidanların rejenere edilerek yeniden kullanılabilir forma getirilmesini de LA'nın sağladığı belirlenmiştir (25-28). Özetle; PTX ve ALA, bu etkileri ile günümüzde önem kazanan antioksidanlar arasında öne çıkmaktadır.

Serbest radikaller hem normal metabolizmanın yan ürünü olarak, hem de ilaçlar ve diğer zararlı kimyasal maddelerin etkisi ile oluşabilmektedir (16). Serbest radikal biyokimyasında anahtar rolü oynayan maddeler, oksijen (O_2), $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalleridir ($\cdot OH$). Serbest radikalleri yok eden savunma sistemi antioksidan sistemdir. Hücre içinde ve hücre dışında bulunan, etki güçleri farklı, ROS'u daha az toksik ürünlere dönüştüren, nötralize eden ya da oluşmasını ve yayılmasını engelleyen pek çok antioksidan vardır.

MTX, bazı kanser hastalarının vazgeçilmez ilacıdır. Fakat oluşturdukları yan etkiler, doz kısıtlamasına veya tedavinin sonlandırılmasına götürebilir bu da hastanın sağ kalımını azaltır. Buna sebebiyet vermeden yan etkilerin ortadan kaldırılması klinik açıdan oldukça önemlidir. Bu sebeple MTX'in önemli yan etkilerinden olan hepatotoksisite ve nefrotoksisiteye karşı antioksidan etkinliği ön plana çıkan Pentoksifilin ve Alfa Lipoik Asit'in etkisini görmeyi amaçladık. Bu amaçla; yapmış olduğumuz çalışmada, periton içine enjeksiyon yoluyla tek doz MTX uygulandı ve sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında meydana getirdiği yapısal değişikliklere karşı PTX ve ALA'nın etkileri incelendi bununla birlikte immünohistokimyasal düzeyde iNOS ve TNF- α yoğunluğu üzerine etkisi ve biyokimyasal değişiklikler karşılaştırıldı; serumda; Aspartat Transaminaz (AST), Alanin Transaminaz (ALT), Alkalen Fosfataz (ALP), Gama Glutamil Transferaz (GGT), Direkt Bilirubin (DBil), Total Bilirubin (TBil), Kan üre nitrojeni (BUN), Üre, Kreatinin (Cr), dokuda; enzimatik antioksidan sistemin ana öğeleri olan Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri, dokuya lökosit invazyonunun bir göstergesi olan myeloperoksidaz (MPO) aktivitesi, lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan malondialdehit (MDA) ve yüksek reaktif oksidan kapasiteye sahip bir bileşen olan NO düzeyleri, önemli serbest oksijen radikali kaynağı olan Ksantin Oksidaz (XO) aktivitesi incelendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer vücuttaki en büyük bez ve en büyük iç organdır. Yaklaşık olarak 1,5 kg ağırlığındadır (29). Karaciğer, fibröz bir bağ dokusu olan Glison kapsülü ile kaplıdır (29) ve organın içine girerek organı lobüllere ayırır. Bu bağ dokusu stroma içinde kan damarları, sinirler, lenfatik damarlar ve safra kanalları bulunur. Glison kapsülünü, seröz bir kılıf olan visseral periton komşu organlara yapıştığı yer haricinde çevreler (29). Karaciğer hilumundan portal ven, hepatik arter ve sinirler girer, sağ ve sol hepatik kanallar ve lenfatikler çıkar.

Karaciğer anatomik olarak derin yarıklarla iki büyük (sağ ve sol) lob ile iki küçük (kuadrat ve kaudat) loba ayrılır. Fakat bu tip anatomik bölmelendirme sadece topografik olarak önemlidir. Fonksiyonel ya da cerrahi bölmelendirme, kan desteği ve safra drenajına göre belirlendiğinden klinik açıdan daha önemlidir (29).

Karaciğer major kan desteğini hepatik portal venden (oksijenden fakir kan), %25 kadarını hepatik arterden (oksijenden zengin kan) sağlar. İki kaynaktan gelen kan karaciğer parankiminin hepatositlerine perfüze olur, karaciğer hücreleri asla tam olarak oksijenli kana maruz kalmazlar. Sinüzoidler hepatositlerle sıkı ilişkidir, kan ve karaciğer hücreleri arasında maddelerin değişimini tedarik eder. Sinüzoidler santral vene ulaşır, santral ven ise sublobular venlere boşalır. Kan karaciğeri hepatik venler aracılığı ile terkeder. Hepatik venler vena kava inferiora boşalır (29).

Karaciğerin bir fonksiyonel üniti tanımlayan, üç tabir bulunmaktadır, klasik lobül, portal lobül ve karaciğer asinusudur (29);

1. Klasik hepatik lobül, karaciğer parankim organizasyonunun geleneksel tanımıdır.

Işık mikroskobu kesitlerinde, kabaca altıgen şeklinde yaklaşık 0,7 x 2 mm boyutlarında görülen doku kütesidir. Klasik lobül bir hücre kalınlığında anastomozlaşan hepatosit tabakaları içerir ve hepatositleri karışık portal ve arteriyel kanla besleyen anastomozlaşan sinüzoid sistemleri ile ayrılır. Herbir lobülün merkezinde nispeten büyük bir venül bulunur ve terminal hepatik venül (santral ven)

olarak isimlendirilir. Santral ven içine sinüzoidler direne olur. Santral venden periferik doğru hücre tabakaları ve sinüzoidler ışınal tarzda yayılır. Altıgenin köşeleri portal alanlar (portal kanal) olarak isimlendirilir ve portal triat içeren gevşek bağ dokusu bulunur. Portal alan lobüllerin en dış hepatositleri ile sınırlıdır. Portal alanın kenarlarında bağ dokusu stroma ve hepatositler arasında küçük bir aralık bulunur ve Mall aralığı olarak isimlendirilir.

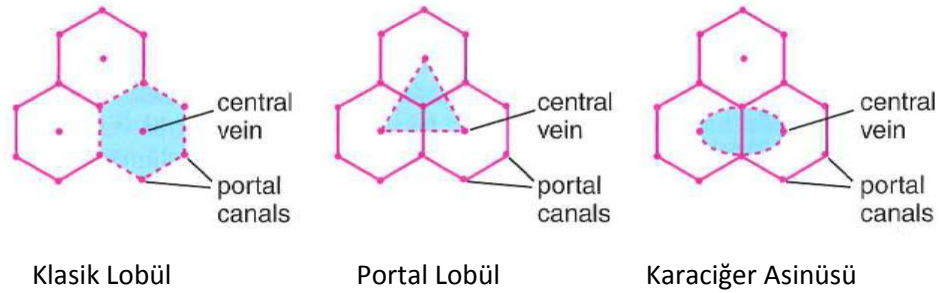
2. Portal lobül, karaciğerin ekzokrin fonksiyonunu (safra üretimini) vurgular.

3. Karaciğer asinusu, kan perfüzyonu, metabolik aktivite ve karaciğer patolojisi arasında en iyi korelasyonu tedarik eden yapısal ünitir. Herbir karaciğer asinusundaki hepatositler, kısa eksenini çevreleyen üç konsantrik elips şeklinde zon içinde düzenlenmiş olarak tanımlanır;

Zon 1: Portal ven ve hepatik arterin dallarının olduğu bölgedir.

Zon 2: Zon 1 ve 3 arasında sınırları tam belli olmayan bir bölgedir.

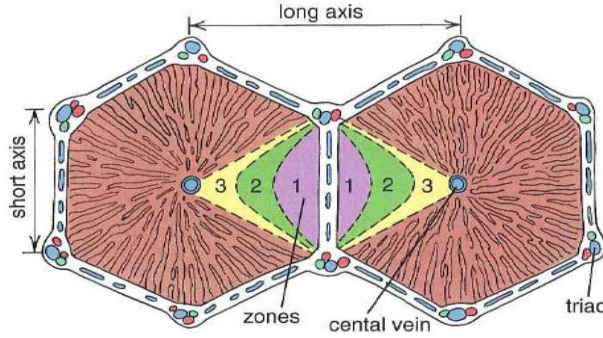
Zon 3: Terminal hepatik venül (santral ven) çevresindeki bölgeyi kapsar (29).



Şekil 1. Klasik karaciğer lobülü, portal lobül ve karaciğer asinüsünün karşılaştırması (29)

Zonlara ayırma, karaciğer parankiminde hepatik hücrelerin vasküler perfüzyonunun derece ve kalitesiyle ilgili dejenerasyon, rejenerasyon ve spesifik toksik etkilerin tanımlanması ve yorumlanması açısından önemlidir. Zon1'deki hücreler sinüzoidal kandan gelen oksijen, toksik maddeler ve besin maddelerini ilk alan hücrelerdir ve safra kanalı oklüzyonunu (staz) takiben oluşan morfolojik değişiklikleri ilk gösteren bölgedir. Bu hücreler, aynı zamanda sirkülasyon bozulursa en son ölen hücrelerdir ve ilk rejenerasyon olan hücrelerdir. Diğer yandan, zon 3'teki hücreler azalmış perfüzyon durumunda iskemik nekrozu ilk olarak gösteren hücrelerdir ve yağ birikimini de ilk gösterirler. Bu hücreler toksik maddelere ve safra

stazına ise en son yanıt verirler. Zon 1 ve 3 arasında aynı zamanda enzim aktivitesi, sitoplazmik organellerin sayı ve boyutları ve sitoplazmik glikojen depozitlerinin boyutları arasında normal değişiklikler bulunmaktadır. Zon 2'deki hücrelerin fonksiyonel ve morfolojik karakteristikleri, zon 1 ve 3 arasındadır. (29)



Şekil 2. Karaciğer asinüsü (29)

Karaciğerin temel yapı elemanı hepatositlerdir ve karaciğer lobüllerinde anastomozlaşan hücre tabakaları şeklinde parankimi oluştururlar. Hepatositler her bir boyutu 20-30 μm ölçümünde büyük, poligonal hücrelerdir. Hepatosit çekirdeği büyük ve sferiktir ve hücre merkezinde bulunur. Erişkin karaciğerinde pekçok hücre çift çekirdeklidir. Her bir çekirdekte iki veya daha fazla iyi gelişmiş çekirdekçik bulunur. İlaveten, karaciğer hücreleri, karaciğer dokusu hepatotoksik oluşumlar, hastalıklar veya cerrahi ile kaybedildiği zaman önemli rejenerasyon yeteneği gösterirler. Hepatositlerin yüzeyinde bitişik oluklardan oluşan küçük kanallar safra kanalikülleridir. Sinüzoidal kapillerler (sinüzoidler), hepatosit tabakaları arasındaki vasküler kanallardır. Hepatik sinüzoidler diğer sinüzoidlerden farklı olarak yıldızsı sinüzoidal makrofajlar olan Kupfer hücrelerini içerirler. Perisinüzoidal aralık (disse aralığı) ise, sinüzoidal endotel ve hepatositler arasında bulunur (29).

Karaciğer ilaçları ve toksinleri indirger (29). Hidrofilik olmayan ilaç ve toksinler böbrekler tarafından dolaşımdan etkin bir şekilde elimine edilemeyebilirler. Karaciğer bu maddeleri daha soluble formlara dönüştürür. Bu proses hepatositler tarafından iki fazda gerçekleştirilir.

Faz 1, Oksidasyon olarak isimlendirilir. Yabancı bileşiklere hidroksilasyonu (OH grubu eklenmesi) ve karboksilasyonu (COOH grubu eklenmesi) içerir. Bu faz hepatosit düz endoplazmik retikulum ve mitokondrisinde gerçekleşir. Proteinleri sitokrom p450 olarak isimlendirilen bir seri biyokimyasal reaksiyonu içerir.

Faz II, Konjugasyon olarak isimlendirilir. Glukuronik asitin, glisin ve taurinle konjugasyonu ile gerçekleşir. Bu proses faz I ürünlerini daha suda eriyebilir hale getirerek böbrekler tarafından ortadan kaldırılmasına yardımcı olur (29).

Hepatositlerde çok sayıda peroksizomlar bulunur. Peroksizomlar oksijen kullanımının majör alanlarıdır. Bu yolda mitokondriyonlara benzer bir fonksiyon geliştirirler. Toksik hidrojen peroksidi oluşturan büyük miktarlarda oksidaz içerirler. Peroksizomlarda aynı zamanda katalaz enzimi bulunur. Katalaz hidrojen peroksidi oksijen ve suya indirger. Bu tip reaksiyonlar karaciğerde oluşan pekçok detoksifikasyon prosesi ile ilgilidir. Hepatositlerde düz endoplazmik retikulum yaygın olabilir fakat bu metabolik aktivite ile değişir. Düz endoplazmik retikulum, toksinlerin, ilaçların ve kolesterol ve lipoproteinlerin lipit bölümlerinin sentezinden sorumlu enzimlerin indirgenmesi ve konjugasyonu ile ilgili enzimler içerir. Hepatositlerin, ilaçlar, toksinler veya metabolik uyarıcılarla karşılaşması durumunda düz endoplazmik retikulum hücredeki dominant organel olabilir. Belirli ilaçlar ve hormonlar, düz endoplazmik retikulumu stimüle etmelerine ilaveten yeni düz endoplazmik retikulum membranlarının ve ilgili enzimlerin sentezini de indüklerler. Düz endoplazmik retikulum, alkol, çeşitli ilaçların ve kemoterapotiklerin uygulanmasını takiben hipertrofiye uğrar (29).

2.2. Böbrek Histolojisi

Böbrek, Sıvı-elektrolit dengesinin korunması, asit- baz dengesinin korunması ve idrar oluşumunda, renin üretiminde, eritropoetin üretiminde, aktif vitamin D3 (1, 25 (OH₂) vit D3) dönüşümünde rol alır (29).

Retroperitoneal bir organdır. Dışardan bağ dokusu kapsülle çevrelenmiştir. Korteks ve medulladan oluşur. Kortekste, böbrek cisimciği, düz tübüller, kıvrımlı tübüller, toplayıcı tübüller ve toplayıcı kanallar bulunurken; medullada, düz tübüller, toplayıcı kanallar ve özel kapiller ağ olan vaza rekta bulunur. Medulladaki tübüller, ‘renal pramitler’ adı verilen konik yapıları oluştururlar. Piramitlerin tabanı kortekse, apeksleri renal sinüse bakar. Her piramit dış medulla ve iç medulla olmak üzere iki bölgeye ayrılır. Medulladaki kortikal dokulara renal sütunlar (Bertini Sütunları) denir. İçeriği korteksle aynı olmasına rağmen medullanın bir bölümü olarak kabul edilirler. Her piramidin apikal bölümü papilla olarak isimlendirilir ve minör

kalikslere açılır. Papillanın uç bölgesi ‘area kribroza’ olarak isimlendirilir. Bu bölgede toplayıcı kanallar tarafından delikler açılmıştır ve minör kalikslere açılır, minör kalikslerde iki- üç major kalikse açılır, major kalikslerde pelvise açılır (29) ve pelvis ise üreter ile devam eder.

Böbrekte meduller piramitlerin sayısı kadar lob bulunur. Her meduller piramit ve beraberindeki kortikal doku böbrek lobunu oluşturur. Böbrek lobülü ise bir toplayıcı kanal ve direne ettiği bütün nefronlardan oluşan yapıdır. Her insan böbreğinde yaklaşık iki milyon nefron bulunur. Her nefron, böbrek cisimciği ve bir tübül sisteminden oluşur. Böbrek cisimciği nefronun başlangıcıdır ve bir kapiller yumak olan ‘glomerulus’ ve çevresinde, ‘Bowman kapsülü’ olarak bilinen iki tabakalı epitel (viseral ve parietal yaprak) içerir. Glomerüler kapillerdeki kan Bowman kapsülüne geçerken filtrasyona uğrayarak ‘glomerüler ultrafiltratı’ oluşturur. Afferent arteriol glomerüle girerek glomerüler kapillerleri oluşturur ve efferent arteriol olarak glomerülü terk eder. Afferent ve efferent arterioller bowman kapsülünün parietal yaprağından girer ve çıkar, bu bölge ‘damar kutbu’ dur. Böbrek cisimciği proksimal kıvrımlı tübül, proksimal düz tübül (henle kulpunun inen kalın kolu (proksimal kalın segment)), İnce segment (henle kulpunun inen ince bölümü), distal düz tübül (Henle kulpunun çıkan kalın kolu) ve distal kıvrımlı tübül (proksimale göre daha az kıvrımlı) den oluşmaktadır (29).

Böbreğin filtrasyon apparatusunu böbrek cismi oluşturur ve glomeruler kapiller endoteli, glomeruler bazal membran ve bowman kapsülünün visseral tabakası (podositler) ndan oluşmaktadır (29).

Bowman kapsülünün viseral ve parietal yaprakları arasındaki mesafe ‘idrar boşluğu’ veya ‘Bowman boşluğu’ olarak isimlendirilir. Böbrek cisimciğinde ilaveten ‘mezangial hücreler’ adı verilen bir grup hücre bulunur. Mezangial hücreler glomerül kapillerlerine bitişik lokalizasyonda bulunurlar ve kapillerlerin bazal laminası ile kuşatılmış durumdadırlar. (perisitler gibi). Mezengial hücrelerin bir bölümü de glomerül dışındadır ve ‘ekstraglomeruler mezengial hücreler’ / ‘Lacis hücreler’ / ‘kutup yastığı hücreleri’ gibi isimler alırlar (29).

Makula densa, jukstaglomeruler hücreler, ekstraglomeruler mezengial hücreler birlikte jukstaglomeruler apparatusu oluştururlar. Distal düz tübüller kendi

nefronlarına ait afferent arteriole değer ve değdiği noktadaki distal düz tübül hücreleri değişikliğe uğrar ve ‘makula densa’ olarak isimlendirilir. Makula densa hücreleri diğer distal tübül hücrelerine göre daha dar ve daha uzundur. Çekirdekleri yakın yerleşimli ve uzundur. Aynı bölgede afferent arteriolün tunika mediasında düz kas hücrelerinde değişiklikler olur. Salgı granülleri içerirler ve çekirdekleri sferik olur. Bu hücreler ‘jukstaglomerüler hücreler’ olarak isimlendirilirler. Salgı granüllerinde renin bulunur. Dolayısıyla jukstaglomerüler apparatus renin anjiotensin aldesteron sistemini aktive ederek kan basıncını düzenler. Kanda renin, anjiotensinojenin anjiotensin 1’e dönüşümünü sağlar (29).

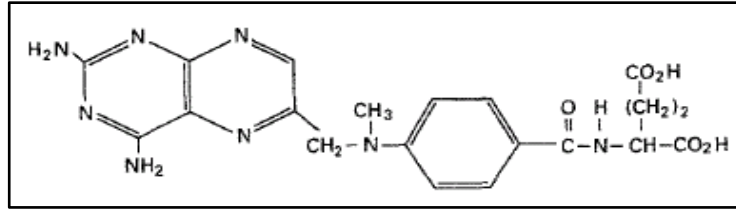
Su, sodyum, bikarbonat böbreklerden kısmen reabsorbe edilir. Glikoz ise böbreklerden tamamen reabsorbe edilir. Cr, organik asitler, bazlar tübüllerin sekretuar aktivitesiyle ultrafiltrata eklenir (29).

Her böbrek abdominal aortanın dalı olan ‘renal arteri’ alır. Renal arter renal sinüste dallanarak interlober arterleri oluşturur. İnterlober arterler piramitler arasında ilerleyerek kortikomeduller sınırdaki ‘arkuat arterleri’ oluştururlar. Arkuat arterlerden ‘interlobüler arterler’ dallanır. İnterlobüler arterler korteks boyunca kapsüle doğru uzanırlar. Böbrekte lobül sınırları tam belirgin olmamasına rağmen interlobüler arterlerin medullar raylar arasındaki ‘kortikal labirentlerde’ yol aldığı görülür. İnterlobüler arterler, her biri bir glomerüle giren ‘afferent arteriollere’ dallanırlar. Afferent arterioller kapiller yumak oluşturduktan sonra ‘efferent arterioller’ olarak glomerülden çıkar. Kortikal glomerüllerden çıkan efferent arterioller ‘peritübüler kapillerleri’ oluştururlar. Jukstamedullar glomerüllerden çıkan efferent arterioller ‘vaza rekta’ ları oluştururlar. Peritübüler kortikal kapillerler; ‘interlobüler venlere’ direne olurlar. Bundan ‘arkuat venler’ ‘interlober venler’ ve ‘renal venler’ yolu ile böbreği terk ederler. Medullar vasküler ağı arkuat venlere direne olurlar. Böbrek yüzeyine yakın peritübüler kapillerler ve kapsül kapillerleri yıldızsı venlere direne olurlar ve bunlarda ‘interlobüler venlere’ direne olarak aynı yolu izlerler (29).

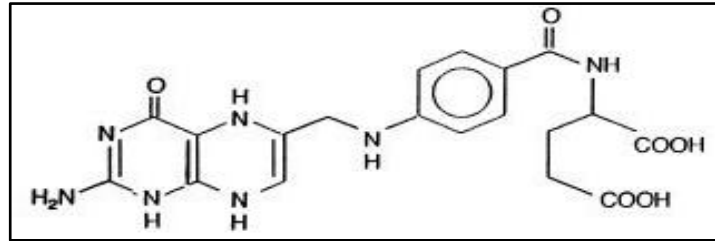
2.3. Metotreksat

2.3.1. Kimyasal Yapısı

MTX, Dihidrofolat (DHF)'in 4-amino- N10 -metil analogudur (30). MTX'in yapısında birden fazla metil grubu vardır ve DHF'taki OH grubu yerine NH_2 bulunur.



Şekil 3. Metotreksat'ın moleküler yapısı (31).

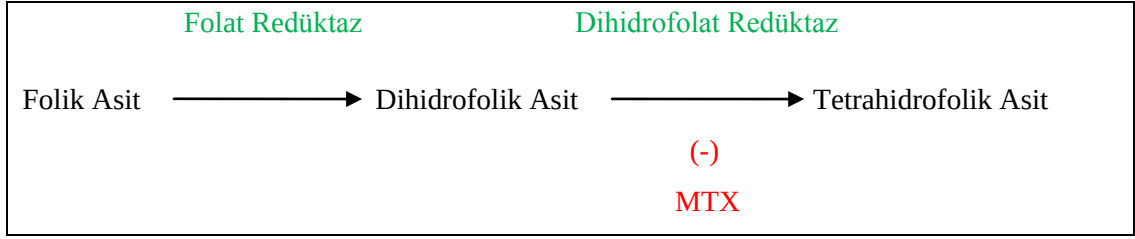


Şekil 4. Dihidrofolatın moleküler yapısı (32).

2.3.2. Farmakodinamik Özellikleri

MTX, bir antineoplastik ilaç grubu olan antimetabolitler grubundandır. Folik asit antimetaboliti olarak etki gösterir. Antimetabolitler normal hücresel yapılara benzerlik gösterirler. Pürin veya pirimidin prekürsörlerinin sentezlerini inhibe ederler veya onlarla yarışarak Deoksiribo nükleik asit (DNA) veya Ribonükleik asit (RNA) sentezini inhibe ederler.

İnsanlarda dietle folat alımı zorunludur çünkü insan vücudunun folatı sentezleme özelliği yoktur. Yapılan bir çalışmada, MTX'in folat antagonist mekanizması olarak iki teori öne sürülmüştür (33): Folatın azalma teorisi; intrasellüler folatın azalması Dihidrofolat Redüktaz (DHFR)'in blokajına dayanmaktadır (33). Yarışma teorisi; MTX'in doğrudan nükleotidlerin sentezinde görevli basamakları inhibe etmesine ve Dihidrofolat (DHF) birikimine dayanmaktadır (33).



Şekil 5. Folik asit metabolizması

MTX, DHFR enzimini geri dönüşümlü olarak inhibe eder (30) ve DHF'nın Tetrahidrofolat (THF)'a dönüşümünü engeller, böylece folat antagonisti gibi davranır. Bu enzimi inhibe ederek, THF sentezinin inhibisyonu, pirimidin timidilat ve pürin nükleotidlerinin biyosentezinin durmasına yol açar. Bu yapıtaşlarının üretilmemesi hücre çoğalması için gerekli olan DNA ve RNA'nın sentezini ve enerji için gerekli olan Adenozin Trifosfat (ATP) yapımını inhibe eder (30).

MTX, antagonisti olan folat gibi normal veya tümöral hücrelerde folilpoliglutamil sentetaz ile 1-4 glutamat gruplarının eklenmesiyle değişikliğe uğrayarak poliglutamit türevlerini (MTX- PGs) meydana getirir (31, 32). MTX poliglutamitleri hücre içinde tutulur ve DHFR enzimine bağlanarak DHF ile yer değiştirir (31, 32). Ayrıca MTX- PGs'leri 5,10 metilen THF redüktaz, glisinamid ribozil 5 fosfat formiltransferaz ve aminoimidazol karboksamid ribozil 5 fosfat formiltransferaz enzimlerini doğrudan inhibe eder. Bu enzimlerdeki inhibisyon pürin ve primidin metabolizmasında inhibisyonla sonuçlanır (31). THF'a dönüşmeden kalan DHF, dihidrofolatpoliglutamitler ve MTX- PGs şeklinde hücrede birikir; kanser hücresi içinde timidilat sentetaz ve transformilaz enzimlerinin inhibisyonundan poliglutamit metabolitleri sorumludur (30). Metabolik yollardaki bu değişiklikler MTX'in hem tedavi edici hem de toksik etkilerinden sorumludur (34).

MTX, antiproliferatif olarak yüksek dozlarda kanser tedavisinde kullanılır (31, 35).

MTX'in iki biyokimyasal mekanizma ile antiinflamatuvar etkide rolünün olduğu öne sürülmüştür; 1- Homosisteinin yeniden metilasyonunun inhibisyonu, 2- Adenozin salınması (36). Adenozinin antiinflamatuvar etkisinin başlıca nötrofiller üzerinde olduğu, nötrofil adezyonunu ve serbest oksijen radikallerinin üretimini engellediği gösterilmiştir. Bu da MTX'in gösterdiği antiinflamatuvar etkiyi

açıklamaktadır (37). Metotreksat, antiinflamatuvar olarak Romatoid Artrit (RA)'de ve psöriatik artrit tedavisinde kullanılmaktadır. TNF- α , interlökin 1- β gibi sitokinler ile metalloproteinazlar gibi inflamasyon mediatörlerinin RA'da MTX tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir (38). B ve T hücrelerindeki aktivite artışının MTX ile baskılandığı gösterilmiştir. MTX, DHFR enzim inhibisyonunun yanında, 5-aminoimidazol- 4- karboksamid ribonükleotit transformilaz enzimini inhibe ederek, intrasellüler ve ekstrasellüler adenosin düzeyini artırmaktadır. Adenosinin, anti-inflamatuar sitokinler olan IL-1 reseptör antagonist (IL-1 ra) ve IL- 10 seviyelerini yükselttiği bilinmektedir (39). MTX, makrofajlardaki IL üretimini ex vivo ve in vivo olarak inhibe eder (40). Hatta, monosit içindeki IL-1 ra/IL-1 oranını artırarak, bu hücrelerdeki inflamatuvar aktiviteyi baskılıyor olabilir (41). RA'lı hastaların idrar, sinovyal sıvı ve lenfositlerinde poliamin seviyeleri yüksek bulunduğu için poliaminler RA'nın patogenezinde rolü olabileceği düşünülmektedir. Poliaminlerin hücre proliferasyonu, farklılaşması ve immün yanıtta önemli görevleri vardır (42). MTX'in immünomodülatör etkisi poliaminlerin sentezindeki inhibisyon ile ilişkili olabilir (31, 42).

Değişik yollarda adenosin deaminaz (ADA)'ın MTX tarafından inhibisyonu deoksiadenosin ve deoksiadenosin trifosfat (dATP) gibi adenosin metabolitlerinin birikimine yol açar. Adenosin, deoksiadenosin ve metilli adenosin metabolitleri yüksek konsantrasyonlarda muhtemelen doğrudan toksik etkilidirler. Deoksiadenosin kromozom kırıklarına ve S-adenozil homosistein (SAH) hidrolaz enziminde inaktivasyona yol açar. SAH-hidrolaz metilasyon reaksiyonları için gereklidir. dATP DNA sentezi için gerekli olan ribonükleotid redüktazı inhibe eder (31). Yapılan bir çalışmada MTX tedavisi ile ADA inhibisyonu geliştiğini destekleyen veriler elde etmişlerdir (43). MTX, metilasyon reaksiyonlarının belirleyicisi olan SAM/SAH oranında azalmaya neden olur. Metilasyon reaksiyonlarının inhibisyonu toksisiteye neden olabilir (31).

2.3.3. Farmakokinetik Özellikleri

MTX oral ya da intravenöz (iv) kullanılır. Düşük dozlarda oral yolla gastrointestinal sistemden tama yakın absorbe olurken, yüksek dozlarda gastrointestinal sistem absorpsiyonu azalacağından iv yol tercih edilir.

MTX'in oral ve iv uygulanması santral sinir sistemi (SSS) hariç iyi doku dağılımı sağlar. MTX'in plevral ya da peritoneal kavite gibi vücut boşluklarına dağılımı yavaştır. Bu nedenle, plevral efüzyon ya da asit gibi nedenlerle meydana gelecek genişlemeler, ilacın yavaş salınımına ve plazma konsantrasyonundaki artışa neden olur ve toksisite bulguları gelişebilir.

MTX, plazma proteinlerine %50 gibi görece düşük oranda ve zayıf bir şekilde bağlanır. Sülfonamidler ve salisilatlar, bu ilaçla birlikte verilirse bağlanma oranını azaltırlar ve MTX'in toksisitesini arttırabilirler (30).

MTX metabolizması, insanlarda genellikle minimal düzeydedir ve karaciğerde bir enzimatik sistem aracılığıyla major metaboliti olan 7-hidroksimetotreksata dönüşür (44).

MTX ve metabolitleri primer olarak böbrekler yoluyla glomerüler ve aktif transport kombinasyonu ile olur. Az bir miktar feçes ve safra ile atılım vardır. Bu yüzden böbrek fonksiyonları bozuk hastalarda ilacın birikmesi daha hızlıdır. IV uygulama sonrası ilk 24 saatte ilacın tama yakını elimine olurken, oral uygulama sonrası ilk 24 saatte ilacın az bir kısmı elimine olmuştur ve takip eden 5 gün içerisinde eliminasyon tamamlanır.

2.3.4. Endikasyonları

MTX, pürin ve pirimidin inhibitörü olduğundan hastalarda immünsupresif ve antineoplastik olarak kullanılmaktadır (45). Metotreksat, yüksek dozlarda birçok malignitenin tedavisinde kullanılırken, daha düşük dozlarda otoimmün hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir terapötik ajandır (46). MTX, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi ve Non- Hodking lenfoma tedavisinde önemli hale gelmiştir (47). Ayrıca osteosarkom, meme, testis, baş ve boyun kanseri ve mukozis fungoidesin tedavisinde de kullanılabilir (30). MTX, meningeal karsinomatosis tedavisinde, meningeal lösemi ve lenfomanın profilaksi ve tedavisinde intratekal olarak kullanılır (48). SSS lenfomalarında MTX'e yanıt oldukça yüksektir.

Lökoverin kurtarma tedavisi ile birlikte uygulanan yüksek doz MTX, osteosarkomun adjuvan tedavisinde kullanılan standart protokolün bir parçasıdır (49). Düşük doz MTX tedavisi koryokarsinomada veya ilişkili trofoblastik

tümörlerde, mitokondriyal membran potansiyelinde azalma yaparak, kaspaz 9 enzimini aktive ederek, Bax/ Bcl- 2 gen ekspresyonunda up- regülasyon yaparak hücrelerde apoptozisi indüklemiştir (50).

Astımla ilgili yapılan bir klinik çalışmada MTX kullanımı ilaç kullanımını azaltmış, semptomların şiddetinde hafifleme (dispne, öksürük gibi) meydana getirmiştir (51). Antiinflamatuvar ve immunsupressif etkileri olan MTX'in düşük doz ve aralıklı kullanımı refrakter romatoid artrit tedavisinde remisyonu sağlamaktadır (48, 51). MTX, Aktif Romatoid Artrit (RA) ve Jüvenil Romatoid Artrit (JRA) için, hastalığı modifiye edici ilaçlar arasında ilk seçenek olmaktadır. MTX, JRA'lı hastalarda yapılmış çift kör, randomize bir çalışmada, plaseboya karşı üstünlük gösteren tek ilaçtır (50). Sonuç olarak antiinflamatuvar ve immünsüpresif etkilerinden dolayı, düşük doz MTX, refrakter romatoid artrit, JRA ve dirençli psöriazis hastalarının tedavisinde de kullanılmaktadır (47, 51). Kalıtsal geçişli bir dermatoz olan Hailey- Hailey hastalığının tedavisinde de kullanılan MTX, burada muhtemelen lökosit fonksiyonlarını baskılamasının yanında, nötrofil ve monosit kemotaksisini inhibe ederek ve epidermal hücre bölünmesini baskılayarak etki göstermiştir (52).

2.3.5. Yan Etkiler

MTX tedavisi esnasında oldukça yaygın şekilde yan etkiler ortaya çıkar. Yan etkinin şiddeti uygulama sıklığı ve doza bağlıdır. En sık rastlanan yan etkiler hafif ve geri dönüşümlüdür ve genellikle iki hafta içinde geri döner. Bulantı, kusma, diare, transaminazlarda (AST, ALT) yükselme ve stomatit gibi yan etkiler sıklıkla dozla ilişkilidir.

Ancak bazı yan etkiler ilacın farmakodinamisinde bahsedilen pürin, pirimidin, folat ve poliamin gibi metabolik yolların bozuklukları ile doğrudan ilişkilendirilmiştir. MTX, folat metabolizmasını antagonize ederek antineoplastik özellik gösterirken, neoplastik hücreler yanında hızlı bölünen hücrelerde de nükleik asitlerin yapımını engeller (53). Bu yüzden, antifolat tedavinin primer toksisitesi ve yaygın etkileri, kemik iliği, cilt ve intestinal epitel hücreleri üzerinedir. Normal hücreler üzerindeki bu toksik etkileri önlemek için (özellikle yüksek doz MTX tedavisine bağlı), MTX ile birlikte başka bir folat analogu olan 5-formil-tetrahidrofolat kullanımı yaygın olarak uygulanan bir protokoldür (8). MTX'in uzun

süre kullanımı hepatotoksisite, nefrotoksisite, pulmoner infiltrasyona ve fibrozise yol açar (54).

Gastrointestinal yan etkilerin MTX'in hücre içinde biriken metabolitlerinin folat seviyelerini azaltmasına bağlı olduğu ileri sürülmüştür. Folat santral sinir sistemindeki nörotransmitterlerin metabolizmasında ve sentezinde kullanılmaktadır. Bu bağlantıya dayanarak metotreksata bağlı gelişen gastrointestinal yan etkilerin santral sinir sistemine bağlı yan etkiler olduğu ve bunun hücre içindeki folat düzeyindeki azalma sonucu ortaya çıktığı belirtilmektedir (55). MTX, sıklıkla oral ve intestinal mukozada inflamasyona neden olur. Bu hasarlanma, hücre çoğalmasının inhibe olmasının sonucu olarak ortaya çıkan intestinal bariyer fonksiyonlarında azalma neticesinde olur. Dolayısıyla makrofaj ve nötrofiller gibi fagositer hücreler, inflamasyon alanına infiltre olur ve ROS üretilir (53).

Romatoid artrit tedavisinde kullanılan düşük doz MTX'e bağlı beklenmeyen en ciddi yan etki pansitopenidir ve bunun gelişmesinde mekanizma tam olarak bilinmemektedir (56). Araştırmacılar, RA'lı hastaların karaciğer biyopsisinde MTX poliglutamatlarının birikmesine folat eksikliğinin eşlik ettiğini göstermiştir (57).

MTX'in akut, subakut ve kronik sendromları içeren pek çok değişik nörolojik komplikasyonla ilişkili olduğu bilinmektedir (58, 59). Klinik sendrom ve bunun ciddiyeti, ilaç uygulama yoluna, dozuna, birlikte kullanılan diğer nörotoksik ajanlara ve hastanın yaşına bağlıdır. MTX tedavisinden sonra görülen iskemik beyaz cevher değişiklikleri, mikroanjiopati ve fokal nörolojik defisitlerin BOS'ta artmış homosistein yüzünden olduğu düşünülmektedir (59). Ayrıca MTX'in hiperhomosisteinemiye sebep olması vasküler hastalık için de bir risk faktörüdür (31, 38). Yapılan bir deneysel çalışmada Wistar sıçanlara intraventriküler MTX verilmesini takiben hipokampusun CA4 bölgesinin etkilendiği saptanmıştır. MTX'in beyin dokusundaki sitotoksik etkisinin nedeni olarak da monoaminlerin dağılımındaki bozulma gösterilmiştir (34).

Dirençli psöriazis hastalarında, özellikle hepatik ve hematolojik birçok yan etkiye rastlanmaktadır. MTX'e bağlı hematolojik yan etkilerin oluşumunda DHFR enziminin inhibisyonu sonucu DNA sentezindeki bozulma ve hızlı hücre değişimine sahip kemik iliğinin baskılanması sorumlu tutulmaktadır (60). Düşük doz MTX

tedavisinde çok nadir de olsa pansitopeni gelişebilmektedir. Mekanizmanın tam olarak bilinemediği bu yan tesirin ortaya çıkışında, yaşlı, böbrek fonksiyonları bozuk, kombine ilaç kullanımı olan hastalar risk grubunu oluşturmaktadır. Literatürde, MTX'in, NSAİD ve trimetoprim- sülfometaksazol gibi antifolat ilaçlarla kombine kullanımında pansitopeni sıklığının arttığını gösteren çalışmalar vardır. Bu nedenle risk grubunda olan hastalarda, MTX ile NSAİD ilaçların aynı gün kullanılmaması önerilir (61).

Yakın zamanlarda sadece yüksek doz değil, uzun süreli düşük doz MTX tedavisi uygulanan romatolojik hasta popülasyonunda da MTX osteopatisi oluşabileceği yönünde pek çok deneysel çalışma ve vaka takdimi vardır (62).

Folat eksikliğinin MTX toksisitesi gelişmesinde bir risk faktörü olduğu belirtilmektedir. Bu amaçla MTX yanına eklenen folik asit ya da folinik asitin toksisiteyi önlemek açısından birbirinden farklı olmadığı bildirilmektedir, ancak folinik asitin maliyeti daha fazladır. Buna karşın, edinilen klinik deneyimler, tedaviye eklenen özellikle fazla miktardaki folik asitin MTX etkinliğini azaltabileceğini ortaya koymuştur (60, 63).

2.3.5.1. Metotreksatın Hepatotoksitesi

Hepatotoksite, MTX tedavisi esnasında oluşan majör komplikasyonlarından (64). MTX'in oluşturduğu karaciğer hasarının mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, intrasellüler MTX-PGs birikimi ve folat azalmasının sorumlu olabileceği düşünülmektedir (65). MTX, NAD⁺ bağımlı mitokondrial enzimler olan piruvat dehidrojenaz, 2- oksoglutarat dehidrojenaz, izositrat dehidrojenaz, malat dehidrojenazı, sitosolik nikotinamid adenozin difosfat bağımlı dehidrojenazı ve malik enzimi inhibe eder (8). Bütün bu sayılan enzimler prolifer hücrelerde, NADPH'nın ana kaynağını oluştururlar. Bundan dolayı MTX kullanımı hücre içi NADPH seviyelerinin azalmasına sebep olabilir (7). Reaktif oksijen türlerine (ROS)'ne karşı önemli bir koruyucu ajan olarak bilinen redükte glutatyonun seviyesini koruyan glutatyon redüktaz enzimi tarafından da NADPH kullanılır (8). Böylece, MTX kullanımına bağlı olarak düşen NADP seviyeleri, hepatositleri reaktif oksijen radikallerine (süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve hipoklorit radikalleri gibi) karşı duyarlılaştıran glutatyon

seviyelerinin düşmesine ve bu da hepatosit hasarına sebep olur (9). MTX, hücre içinde poliglutamat formunda tutulur. MTX kullanımı ile hücre içindeki poliglutamat formunun miktarı artar ve folik asit (FA) seviyeleri düşer (66). Bu da hepatosit nekrozuna sebep olur. Bu bilgiler dahilinde bazı araştırmacılar ise, hepatotoksisitenin sebebi olarak; NADPH azalmasının oksidatif strese karşı hepatositlerde hassasiyet geliştirmesi ya da MTX'in hepatositlerde uzun vadede birikimi sonucu oluşan MTX-poliglutamat formlarının oluşması (4, 66) olarak vurgulamıştır.

MTX ile tedavi sırasında gelişen hepatotoksisite de mikroskobik düzeyde, hepatositlerde dejenerasyon, piknotik çekirdek ve perinükleer vakuolizasyon, aktive Kupffer hücrelerinde artış (67), sinüzoidal dilatasyon ve konjesyon (67, 68), periportal mononükleer hücre infiltrasyonu, portal alanda belirgin fibroblast aktivasyonu, hepatositlerde belirgin makroveziküler yağlanma (68) görülebilir.

2.3.5.2. Metotreksatın Nefrotoksisitesi

MTX'in %90'dan fazlası böbrekler yoluyla atılır (69). MTX'in yüksek doz kullanımı sırasında akut renal yetmezlik gelişebilir; serum kreatinin düzeyinde artış, üremi ve hematüri gelişebilir. Bu yüzden nefrotoksisite, MTX'in önemli yan etkilerindendir (12). RA'lı hastalarda düşük doz MTX tedavisi sırasında da glomerüler ve tübüler fonksiyonlarda değişiklik bildirilmiştir (70, 71). MTX aracılı renal toksisitenin mekanizması aşağıdaki gibidir: MTX'in direk toksik etkisi (12, 72), DNA sentezi ile ilgili birçok enzimin inhibisyonu (12, 73), reaktif oksijen ürünlerinin gelişmesi (11, 12). Yüksek doz MTX'in sebep olduğu renal toksisitenin en yaygın görülen şekli akut renal yetmezliktir ve genellikle de patofizyolojisinde MTX ve metabolitlerinin asidik idrarda presipitasyonundan bahsedilir. Yüksek doz MTX alırken, akut renal yetmezliği önlemek için yeterli idrar akışı ve üriner alkalinizasyon esastır (12). MDA ve TNF- α 'nın doku konsantrasyonlarının temelinde, MTX aracılı nefrotoksisitenin muhtemel mekanizmasının folat sentezinin blokajından daha çok MTX'in direk yaptığı toksisite etkilidir (74).

Lökoverinle birlikte uygulanan yüksek doz MTX, hastaların çoğu tarafından iyi tolere edilse de, MTX ve metabolitlerinin renal tübüllerde birikmesi ile potansiyel olarak yaşamı tehdit edici olabilen nefrotoksisite gelişebilir. Asidik idrarda presipite olan MTX, obstrüktif üropati nedeniyle oligo- anürik böbrek hasarı oluşturabilir.

İlaçlarla gelişen böbrek hasarı; tübüler epitelyal hücre hasarı, hemodinami aracılı böbrek hasarı, obstrüktif nefropati, glomerüler hastalıklar, tübülointerstisyel hastalıklar (papiller nekroz, nefrokalsinozis, kronik interstisyel nefrit, akut alerjik interstisyel nefrit), renal vaskülit, trombozis ve kolesterol embolisi şeklindedir (75-80).

2.4. Serbest Radikaller, Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Serbest radikaller, yörüngelerinde bir veya daha fazla sayıda eşleşmemiş elektronun olduğu atom veya atom gruplarıdır (81). Bu eşleşmemiş elektron nedeniyle kararlı yapı kazanabilmesi için elektronunu başka bir elektronla eşleştirmesi gerekir. Bu nedenle serbest radikalın kimyasal aktivite potansiyeli yüksek ve güçlü oksitleyici niteliktedir (30, 82). Moleküler oksijenin kendisi toksik değilken, oksijenin tam olmayan indirgenmesi ile oluşan oksijen radikalleri toksisite oluşturmaktadırlar. Radikaller ve diğer reaktif oksijen türleri, bazı sorumlu sentezler (örneğin; aktive fagositler tarafından) ve kimyasal yan-reaksiyonlar yoluyla (mitokondriyal elektron transport zincirleri, mikrozomal elektron transport zincirleri ve ksantin oksidaz, siklooksijenaz, lipooksijenaz, monoamin oksidaz, indolamin ve triptamin dioksijenazlar, galaktoz oksidaz gibi oksidan enzimler (30)) insan vücudunda sürekli üretilirler (83) bunun dışında çok sayıda eksojen faktör de hücrelerde serbest oksijen radikali oluşumunu artırır (sigara dumanı, iyonizan radyasyon, nitrojen dioksit, ozon, azot protoksid, güneş ışığı, ısı şoku, glutatyonu oksidleyen maddeler, bazı ilaçların oksidasyonu sırasında ve redoks yapan maddelerin yıkımı sırasında) (30).

Bu maddeler; sitoplazmik membranın ve hücre içi organel membranının lipidlerinin peroksidasyonuna ve membran permeabilitesinin artmasına, enzimlerin ve sitostrüktürel proteinlerin sulfidril gruplarının oksitlenmesine ve çapraz bağlanmasına, enzimlerin inaktivasyonuna, antiproteazların inhibisyonu sonucu dirençli proteolitik enzimlerin aktivasyonuna, DNA yapısının bozulmasına ve kırılmasına (mutasyona) ve mukopolisakkaridlerin depolimerizasyonuna neden olurlar, proteoglikan ve glikozaminoglikan moleküllerinde de oksidatif zedelenme yaparlar. Hücrede iyon transportunu ve transmembranal potansiyeli bozarlar (30).

Bunlar enzimatik ve nonenzimatik antioksidan savunma sistemleri tarafından kaldırılırlar. Fakat antioksidan savunma sistemleri yetersiz olduğu zaman oksidatif stres adı altında yağlara, proteinlere, karbonhidratlara ve DNA'ya zarar verebilirler (83). Sonuçta metabolik bozukluklar, hücre hasarı ve hatta ölüme yol açarlar (84).

Oksidatif streste etkili olan

1. Reaktif Oksijen Türleri;

a) Serbest radikaller:

Süperoksit (O_2^-), Hidroksil (OH^-), peroksil (RO_2^-), hidroperoksil (HRO_2^-). Alkoksil (LOO^-)

b) Nonradikaller:

Hidrojen peroksit (H_2O_2), Hipoklorik asit ($HOCl$), Lipit Hidroperoksit ($LOOH$)

c) Singlet oksijen

2. Reaktif nitrojen türleri:

a) Serbest radikaller:

Nitrik oksit (NO), Nitrojen Dioksit (NO_2^-), peroksinitrit ($ONOO^-$), nitroz oksit (HNO_2),

b) Nonradikaller:

Alkil peroksinitrat ($RONOO$) (85-87).

Hücrelerde ve ekstrasellüler sıvıda sitotoksik oksijen radikallerini zararsız duruma getirmeye çalışan antioksidan savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar normal biyokimyasal olaylar sırasında az miktarda oluşan radikalleri nötralize edebilirler. Ancak hiperoksi, iskemiden sonra reperfüzyon, dokularda reaktif oksijen radikalleri oluşturan ksenobiyotiklere maruz kalma ve bu radikalleri bol miktarda oluşturan aktive edilmiş nötrofiller ile diğer fagositlerin dokuda toplanması gibi durumlarda oksidan/antioksidan dengesi bozulursa antioksidan mekanizmalar tükenir (deplezyon); sonuçta sitotoksik radikal etkinliği artar ve hücre zedelenmesine ve ölümüne yol açar. Antioksidan savunma mekanizmalarının başlıcaları şunlardır;

1. Daha az toksik ürünlere dönüştüren antioksidan enzim sistemleri:

Katalaz (CAT),

GSH Redüktaz (GSHR),

Süperoksit Dismutaz (SOD),

Glutasyon Peroksidaz (GSHPx),

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) vb.

2. Radikalleri yakalayıp nötralize eden antioksidan maddeler (scavenger):

E vitamini,

Taurin,

Ürik asid,

Askorbik Asit (C vitamini),

İndirgenmiş glutasyon (GSH),

Beta-karoten (pro-vitamin A),

Yüksek molekül ağırlıklı olan mukus ve albümin.

3. Reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını önleyen ve oluşanın yayılmasını engelleyen (kompartmanize eden) sistemler:

Ferritin,

Transferin,

Seruloplazmin,

Mitokondriyal sitokrom oksidaz (30).

SOD enzimi, süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizlemektedir. SOD enzimi, süperoksit düzeylerini kontrol etmede önemli bir rol üstlenmektedir. SOD'un üç tipi bulunmaktadır. Bunlardan ikisi sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn içeren izomer (Cu/Zn-SOD) ile mitokondride bulunan tetramerik, Mn ihtiva eden izomerdir (Mn-SOD). Üçüncü tip ise ekstraselüler SOD'dur. SOD'nin ekstraselüler aktivitesi çok düşüktür. Genel olarak, hücrede en bol bulunan izomer sitozolik Cu/Zn-SOD'dur (88).

SOD'un oluşturduğu H_2O_2 , fazla miktarda ise indirgenmiş CAT tarafından suya ve O_2 'ye dönüştürülerek yok edilir (30). Enzim dokularda başlıca mitokondride ve peroksisom partiküllerine bağlı olarak bulunmaktadır. Bundan başka endoplazmik retikulum ve sitoplazmada da aktivite göstermektedir (88).

SOD'un oluşturduğu H_2O_2 , ufak miktarda ise GSH-Px tarafından suya ve O_2 'ye dönüştürülerek yok edilir (30). GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır (88).

Lipidler, biyolojik yapılar içinde reaktif oksijen ürünlerinin toksik etkilerine en duyarlı yapılardır. Lipid peroksidasyonu sırasında biyolojik yapılardan kolayca tespit edilebilen ve peroksidatif hasarın belirteci olan MDA oluşur (89). Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan bileşiklerden olan MDA'nın ölçümü doku hasarının iyi bir göstergesi kabul edilmektedir (90).

Nötrofil ve monositler, primer lizozomal granüllerinde bir hem enzimi olan MPO ihtiva ederler. Polimorf nötrofil lökositlerin % 90'dan fazlasını oluşturan nötrofiller; kompleman fragmanları, HO , reaktif oksijen radikalleri ve sitokinler tarafından aktive edilirler. Dokuya gelen aktive lökositler MPO, elastaz, proteaz, kollojenaz, laktoferrin ve katyonik proteinler gibi enzimleri açığa çıkarırlar. Bu enzimler hem dokudaki hasarı artırır, hem de daha fazla radikal oluşmasına neden olur. İnflamasyon durumunda MPO ekstrasellüler ortama salınır. Bu nedenle nötrofil sekestrasyonunun göstergesi olarak MPO aktivitesinin ölçülmesi duyarlı bir testtir (91).

Tek sayıda elektron içeren ve renksiz gaz şeklinde bulunan inorganik bir serbest radikaldir. NO , L-argininden üç farklı Nitrikoksit sentaz (NOS) enzimi aracılığıyla sentezlenir. Bu 3 izoform şu şekildedir; Tip 1: nöronal NOS (nNOS), Tip 2: indüklenbilir NOS (iNOS), Tip 3: endotelial NOS (eNOS). Tip 1 ve tip 3, fizyolojik şartlarda oluşan NO sentezinden büyük ölçüde sorumlu iken, patolojik şartlarda belirli sitokinlerin uyarısıyla oluşan NO sentezinden iNOS sorumludur. Üretilen NO yapısı aynı, üretilen miktar ve üretim süresi farklıdır (92). NO kaynaklı toksisitede asıl sorumlu, O_2^- nin NO ile reaksiyonu sonucu oluşan $ONOO^-$ olabilir. Fizyolojik pH'da $ONOO^-$ derhal OH ve NO_2^- 'ye parçalanır. Çok güçlü bir prooksidan olan $ONOO^-$, SOD ile reaksiyona girerek güçlü bir nitratlayıcı ajan oluşturur.

Sonuçta hücresel proteinlerin tirozin kalıntılarının nitratlanması, hücresel disfonksiyon ve ölüme yol açabilir (93, 94).

XO, çok önemli serbest oksijen radikali kaynağıdır. Pürinlerin hidroksilasyonunun katalizlenmesinde, molibden, demir ve sülfür flavinin hidroksilasyonunda görev yapan enzim grubunun üyesi olarak bilinir. XO, hipoksantini ksantine, ksantini ürik aside dönüştüren reaksiyonları katalizler. Bu esnada moleküler oksijen indirgenerek $O_2^{\cdot-}$ anyonuna dönüştürülür (95).

2.5. Metotreksat Toksisitesi ve Oksidatif Stres

Antikanser ilaçlarla yapılan son zamanlardaki toksisite çalışmalarında oksidatif stres üzerinde durulmaktadır. Karaciğer, böbrek, ince barsak ve SSS'deki MTX'in yan etki mekanizması olarak oksidatif stres sorumlu tutulmaktadır (4, 6, 11, 96-99). HeLa hücresi mitokondrisinde pirüvat dehidrojenaz, 2-okzogluterat dehidrojenaz ve NAD bağımlı enzimler ile sitozolik NADP bağımlı dehidrojenazın, MTX tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir (11). Yapılan çalışmada MTX'in, HeLa hücrelerinde vücudun önemli antioksidanı olan glutatyon seviyelerini azalttığını göstermişlerdir (11). Yapılan başka bir çalışmada 20 mg/kg tek doz MTX i.p. uygulanan sıçanların kanında, karaciğer ve böbrek dokularında; myeloperoksidaz aktivitesinde artış, glutatyon seviyelerinde azalma ve MDA seviyelerinde belirgin artış olduğunu bulmuşlardır (4). Başka bir çalışmada, MTX'in yan etkisi olarak sıçan ince barsağında SOD ve CAT aktivitelerinde artma, glutatyon seviyelerinde azalma olduğunu göstermişler ve MTX'in yol açtığı ince barsak hasarında oksidatif stresin önemli rolünü ortaya koymuşlardır (6). Başka bir çalışmada, MTX alan sıçanların böbrek dokularında NO seviyelerinde artışı bildirmişlerdir (96). Bu nedenle MTX toksisitesinden korunmak için antioksidan ajanlarla birlikte kullanması gerekliliği öne çıkmaktadır.

2.6. Pentoksifilin (Okspentifilin)

PTX, ksantin derivesi olan bir metilksantindir. cAMP fosfodiesterazının nonspesifik inhibitörü olarak bilinir. Klinik olarak yetersiz doku perfüzyonuyla ilişkili periferik vasküler ve serebrovasküler hastalıkların tedavisinde geniş kullanımı vardır (13). Vazodilatör etkisi mutad dozlarda verildiğinde belirgin değildir.

Terapötik etkinliği esas olarak aşağıdaki hemoreolojik etkileriyle kan akımını ve dokuların oksijenlenmesini artırmasına bağlıdır: (i) Kronik okluzif arter hastalığında eritrositlerin azalmış olan esnekliğini (fleksibilitesini veya deformabilitesini) artırır, kanın yükselmiş olan viskozitesini düşürür ve akışkanlığını artırır. Kapillerlerin çapı, dokuların çoğunda eritrosit çapından ufak olduğu için fleksibilite artmasının kapiller kan akımını hızlandırma bakımından büyük önemi vardır. Bu olay Pentoksifilin'in cAMP fosfodiesterazını inhibe etmesine ve sonuçta eritrositlerin içindeki cAMP düzeyini artırmasına bağlıdır. (ii) periferik damar hastalıklarında trombositlerin artmış olan agregasyon yeteneğini azaltır (30).

Mide-barsak kanalından iyi absorbe edilir. Karaciğerde metabolize edilmek suretiyle inaktive edilir. Acil durumlarda iv formunu da kullanmak mümkündür (30).

Başlıca yan tesirleri bulantı, yüzde kızarma (flushing), baş dönmesi, baş ağrısı ve gastrointesitinal bozukluklardır (30).

Pentoksifilin, TNF- α sentezini (14, 15) ve TNF- α 'nın indüklediği makrofajik NO sentezini (14, 16-19) bloke eder. Bunu intraselüler siklik adenosin 3' 5' monofosfat ve siklik guanosin 3' 5' monofosfat konsantrasyonlarını artırarak yapar. Pentoksifilinin inflamatuvar sürecin inhibisyonunda rol oynadığını gösteren kanıtlar artmaktadır (100). Pentoksifilinin rapor edilen diğer etkileri; monosit kemoreaktan protein-1, interlökin 6, interlökin 8 ve makrofaj inflamatuvar protein Ia ve Ib inhibisyonu, endotelial hücre üzerinde adezyon moleküllerinin ekspresyonunun azaltılması, nötrofil aktivasyonunun baskılanması, lenfosit ve monosit proliferasyonunun, lökositlerin bağlanma ve migrasyonunun engellenmesini içerir (14-19, 101-103). Diğer çalışmalarda da PTX'in, IL-1, IL-8, IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin yanısıra nötrofil superoksit anyon üretimini ve degranülasyonunu, nötrofil ve lenfosit adezyonunu ve transendotelial migrasyonu engellediği gösterilmiştir (104, 105). PTX, hemorajik şokun sıvı resusitasyonunda bir tamamlayıcı olarak yaygın olarak çalışılmıştır ve birçok yararlı etkisi tespit edilmiştir. PTX'in; kardiyak outputun düzeltilmesinde, proinflamatuvar sitokinlerin (TNF-a, IL-1, IL-6) sentezinin azaltılmasında, karaciğerde sinüzoid endoteliumuna lökosit adezyonunu azaltmada, hepatik ve intestinal kan akımını düzelttiği, hemorajik şokta sağ kalımı arttırdığı gösterilmiştir (106).

2.7. Alfa Lipoik Asit

ALA, bazı yiyeceklerde bulunan ve aynı zamanda vücutta sentezlenen doğal bir maddedir. Lipoik asit mitokondride oktanoik asit ve bir sülfür kaynağından sentez edilmektedir (21). Okside lipoik asit ve redükte lipoik asit olarak 2 formu bulunmaktadır. Redükte lipoik aside dihidrolipoik asit de denmektedir (107). Lipoik asit oral alındığında veya intravenöz kullanıldığında hızla absorbe edilir ve hücre içine girerek burada daha aktif formu olan dihidrolipoik aside indirgenir (108). ALA ve DHLA her ikisi de aynı zamanda β - oksidasyona uğrarlar. Hem ratlarda hem de insanlarda ALA idrarla atılır, ana metaboliti 4,6 bismetilmerkaptotioheksanoik asittir (108). ALA, beyni de içerisine alan çeşitli dokularda hücrelerin sitoplazmasında bulunan glutatyon redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz tarafından NADPH'nin varlığına bağlı olarak dihidrolipoik asite dönüştürülür (24, 25, 109-111). Dihidrolipoik asit biyolojik olarak daha aktiftir (112).

Lipoik asit oral verildiğinde %93'den fazlası barsaktan emilir, karaciğerde metabolizmayla %20-30 ilk geçiş etkisine uğrar (113). ALA'nın insanlardaki primer metabolik yolu S-metilasyon β -oksidasyondur (114). LA açıl taşıyıcı olup iki elektron taşımakla görevlidir. α - ketoglutarat dehidrogenaz ile pirüvat dehidrogenaz enzim kompleksleri içinde bulunur (115). LA pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonunda koenzim olarak görev yapmaktadır (116).

LA'nın hücre içi ROS'ların pek çoğunun radikalik etkisini süpürerek oksidatif stresle savaştığı pek çok çalışma ile gösterilmiştir (23-25). ROS'ların radikal etkilerinin süpürülerek ortadan kaldırılması bir tarafa vitamin C, vitamin E, ve glutatyon (GSH) gibi diğer hücrel antioksidanların rejenere edilerek yeniden kullanılabilir forma getirilmesini de LA'nın sağladığı belirlenmiştir (25-28). DHLA'nın hem prooksidan hem de antioksidan özelliklere sahip olduğu bazı çalışmalarda (25, 28, 117, 118) gösterilmiş olmasına rağmen hem LA hem de DHLA güçlü antioksidan aktivite gösterir. ALA, oksidatif hasarın oluşturduğu karaciğer patolojisinde (111), ağır metal toksisitesinde (119) ve diyabetik polinöropatide (120) oluşan hasarlara karşı α -LA koruyucu rol üstlenmektedir.

Lipoik asidin etkileri;

- 1) Serbest radikalleri uzaklaştırmak,
- 2) Metal şalazyon,
- 3) Antioksidan rejenerasyon,
- 4) Moleküler hasar onarımı,
- 5) Glikasyon yolu ile yaşlanmayı azaltır,
- 6) Doğal enerji verici olarak özetlenebilir (22).

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamız, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından 3696-TU2-13 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada; Sprague-Dawley cinsi 230–300 gr ağırlık aralığında toplam 48 adet erkek rat kullanıldı. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Üretim Biriminde üretilmiş olan ratlar deney süresince standart nem, ışık (12 saat gün ışığı / 12 saat karanlık), ısı (25° C) koşullarında bulunduruldu. Deney süresince farelerin su ve yeme (Yem Kurumu Standart Fare Yemi) sınırsız erişimine (ad libitum) izin verildi.

Çalışmamız, Süleyman Demirel Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı ve tüm çalışma boyunca etik kurallara uyuldu.

3.1.2. Kullanılan İlaçlar

1. Metotreksat, METHOTREXATE- Koçak Farma
2. Alfa Lipoik Asit, THIOCTACID 600T- MEDA
3. Pentoksifilin, TRENTİLİN- Berksam İlaç
4. Ketamin HCl, KETAMİN %10- Brema
5. Ksilazin HCl, ALFAZYNE %2- Ege Vet

3.1.3. Kullanılan Malzemeler ve Aletler

1. Biyokimya otoanalizörü (Mindray BS 800 M, Çin)
2. Derin dondurucu (Beko 8460 T, Türkiye)
3. Hassas terazi (Shimadzu AX200, Japonya)
4. Homojenizatör (Heidolph DIAX 900, Almanya)
5. Otomatik pipetler (Eppendorf Research 10-100-1000-5000, Almanya)
6. pH metre (Hanna Instruments, Portekiz)
7. Su banyosu (Termal Laboratuvar aletleri 820-3, Türkiye)
8. Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 32 R, Hettich Universal 320, Almanya)
9. UV spektrofotometre (Shimadzu UV 1700, Japonya)
10. Vorteks (Nüve NM 100, Türkiye)
11. Kızaklı Mikrotom (Leica SM2000R, Almanya)
12. Binoküler mikroskop (Olympus CX21FS, Japonya)
13. Etüv (Heraeus D63450, Almanya)
14. Mikrodalga (Beko MD 1500, Çin)

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Tri- Sodium Sitrat Dihidrat, Merck
2. Sodium Carbonate Anhydrous, Merck
3. Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent, Merck
4. Trichloroasetic Acid (TCA), Merck
5. 2- Thiobarbituric Acid (TBA) Reagent For Sorbik Acid, Merck
6. Xanthine ≥ 99 %, Sigma
7. EDTA Disodium Salt Dihydrate (Titriplex III), Merck
8. Nitro Blue Tetrazolium Chloride (NBT), Merck

9. Albumin Fraction V (From Bovine Serum), Merck
10. Copper (II) Chloride Dihydrate, Merck
11. Ammonium Sulfate, Merck
12. Xanthine Oxidase From Bovine Milk, Grade 1, Ammonium Sulfate Suspension, 0.4-1.0 Units/Mg Protein, Sigma
13. Chloroform Gr For Analysis, Merck
14. B-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Reduced Tetrasodium Salt, Merck
15. Glutathione Reductase From Baker's Yeast, Ammonium Sulfate Suspension, 100-300 Units/Mg Protein (Biuret), Sigma
16. Sulfanilamide Gr For Analysis, Merck
17. Copper(II) Sulfate Pentahydrate, Merck
18. Sulfuric Acid %98-95 Extra Pure, Merck
19. Sodium Borate- Di- Sodium Tetraborate Decahydrate Extra Pure, Merck
20. Zinc Sulfate Heptahydrate, Merck
21. Potassium Nitrate, Merck
22. Adenosine $\geq 99\%$, Sigma
23. Phenol Extra Pure, Merck
24. Sodium Nitroprusside Dihydrate, Merck
25. Sodium Cyanide Reagent Grade, %97, Sigma
26. Sodium Azide Extra Pure, Merck
27. Glycine Gr For Analysis, Merck
28. Hexadecyltrimethylammonium Bromide, Merck
29. 4-Aminoantipyrine (4-AAP), Merck
30. Cadmium Granülleri, Merck
31. iNOS Antibody, Abcam

32. TNF- α Antibody, Abcam
33. SensiTek HRP Anti-Polyvalent, Syctek
34. Phosphate Buffered Saline Ph7.6(PBS), Syctek
35. DAB Chromogen, Syctek
36. Hidrojen Peroksit %30, Thermo Scientific
37. PAP Pen-Mini, Beckman
38. Ksilen, Sharlue
39. Parafin, BDH
40. Ethanol, Carloerba
41. Formaldehit, Roth
42. Hematoksilen boyası, Merck
43. Eozin boyası, Merck
44. Asetik asit, Fluka
45. Hidroklorik asit, Merck

3.2. Metod

3.2.1. Deneysel Model

Sprague-Dawley cinsi 48 rat, sağlıklı kontrol 8 ve diğer gruplar 10'ar lı olmak üzere rastgele seçilerek aşağıdaki gibi 5 gruba ayrıldı.

Grup I (Sağlıklı kontrol grubu) (n=8): 1. günden itibaren 10 gün boyunca aynı gün diğer hayvanlara verilen ilacın ortalama hacminde Serum Fizyolojik (SF) intraperitoneal (ip) enjeksiyon yoluyla verildi.

Grup II (MTX grubu) (n=10): Çalışmanın 4. günü, MTX 20 mg / kg tek doz ip olarak uygulandı. İlaç uygulanmayan günlerde ise aynı gün diğer hayvanlara verilen ilacın ortalama hacminde SF ip olarak uygulandı.

Grup III (MTX+ PTX grubu) (n=10): PTX 50 mg / kg ip olarak 1. günden itibaren 10 gün verildi. MTX ise sadece 4. gün Grup II'deki gibi verildi.

Grup IV (MTX+ ALA grubu) (n=10): ALA 100 mg / kg ip olarak 1. günden itibaren 10 gün verildi. MTX ise sadece 4. gün grup II'deki gibi verildi.

Grup V (MTX+ PTX+ ALA grubu) (n=10): PTX 50 mg / kg + ALA 100 mg / kg ip olarak 1. günden itibaren 10 gün verildi. MTX ise sadece 4. gün grup II'deki gibi verildi.

Tablo 1. Deneyde gruplara uygulanan ilaçlar

Günler	Grup I (Kontrol)	Grup II (MTX)	Grup III (MTX+PTX)	Grup IV (MTX+ALA)	Grup V (MTX+PTX+ALA)
1. gün	SF	SF	PTX	ALA	PTX+ ALA
2. gün	SF	SF	PTX	ALA	PTX+ ALA
3. gün	SF	SF	PTX	ALA	PTX+ ALA
4. gün	SF	MTX	MTX+ PTX	MTX+ ALA	MTX+ PTX+ ALA
5. gün	SF	SF	PTX	ALA	PTX+ ALA
6. gün	SF	SF	PTX	ALA	PTX+ ALA
7. gün	SF	SF	PTX	ALA	PTX+ ALA
8. gün	SF	SF	PTX	ALA	PTX+ ALA
9. gün	SF	SF	PTX	ALA	PTX+ ALA
10. gün	SF	SF	PTX	ALA	PTX+ ALA

SF; Serum Fizyolojik, MTX; Metotreksat, PTX; Pentoksifilin, ALA; Alfa Lipoik Asit

3.2.2. Anestezi, Doku ve Kan Örnekleri

Beslenmesi bir gece önceden kesilen ratlara, son ilaç uygulamasından 24 saat sonra (deneyin 11. günü) ketamin hidroklorid (90 mg / kg) ve ksilazin hidroklorid (10 mg / kg) karışımı ip uygulanarak anestezi oluşturuldu. Daha sonra tüm ratlar sakrifiye edilerek doku örnekleri ve intrakardiyak kan örnekleri alındı. Histokimyasal ve immünohistokimyasal incelemeler yapılmak üzere alınan doku örneklerinden bir kısmı 3-5 cm kalınlığında parçalara bölünerek tespit için % 10 nötral formalin solüsyonuna konurken, kalan doku örnekleri biyokimyasal analizler yapılmak üzere - 20 °C'lik derin dondurucuda muhafaza edildi. Biyokimyasal analizler yapılmak üzere alınan kan örnekleri ise alındığı gün analiz edildi.

3.2.3. Kan Örneklerinde Biyokimyasal Analizler

Katkı maddesi içermeyen biyokimya tüplerine alınan rat kanları 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen serum örneklerinde ALT, AST, ALP, GGT enzim düzeyleri ve TBil, DBil, BUN, Üre, Cr düzeyleri biyokimya otoanalizöründe fotometrik olarak ölçüldü.

3.2.4. Doku Örneklerinde Biyokimyasal Analizler

SOD, CAT, GSH-Px, MPO, XO enzim aktiviteleri, MDA, NO ve protein düzeyleri Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında spektrofotometrik yöntemle ölçüldü.

3.2.4.1. Numunelerinin Korunması, Homojenizasyonu ve Deney için Hazırlanması

Homojenizasyon işlemi başlangıcında -20°C den çıkarılıp çözünen dokuların yaş ağırlıkları hassas terazide tartılarak kaydedildi. Dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe konup dokuların üzerine 2 ml soğuk pH: 7,4 olan 0,2 M Tris-HCl tamponu eklendi. Buz doldurulmuş plastik kaplar içine yerleştirilen cam tüpteki dokular 16000 devir/ dakika hızda homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde tampon ilave edilerek tampon miktarları kaydedildi. Tekrar homojenize edilerek 3 dakikaya tamamlandı. Homojenatlar soğukluğu korunarak eppendorf tüplerine aktarıldı ve tüpler numaralandırıldı. Yaş doku ağırlıkları ve ilave edilen tampon miktarları kaydedildi. Elde edilen homojenatlardan; MDA, NO ve protein miktar tayini yapıldı. Daha sonra homojenatlar, 5000 devir / dk hızında 30 dakika süreyle +4 C soğutmalı santrifüjde santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Ayrılan süpernatantlardan; CAT, XO enzim aktiviteleri ile protein miktar tayini yapıldı. Elde edilen süpernatantlar 1 / 1 (v / v) oranında kloroform / etanol (3 / 5, v / v) ile vortekslenip cam tüpte 3200 devir / dk hızında 40 dakika +4 C'de santrifüj edildi. Üstte oluşan etanol fazından GSH-Px, SOD enzim aktiviteleri ve protein miktar tayini yapıldı.

MPO enzim aktivite tayininde kullanılan homojenizasyon solüsyonu farklı olduğu için bütün işlemler MPO enzim aktivite tayini için ayrıca tekrarlandı.

Homojenizasyon işlemi başlangıcında dokuların yaş ağırlıkları hassas terazide tartılarak kaydedildi. Dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüpe konup dokuların üzerine 1 ml soğuk %0,5'lik HDTMAB (Hexadeyltrimethylammonium Bromide) eklendi. Buz doldurulmuş plastik kaplar içine yerleştirilen cam tüpteki dokular 16000 devir/dakika hızda homojenize edildi. Son hacim, doku ağırlığının 10 katı olacak şekilde %0,5'lik HDTMAB ilave edilerek tampon miktarları kaydedildi. Tekrar homojenize edilerek 3 dakikaya tamamlandı. Homojenatlar soğukluğu korunarak eppendorf tüplerine aktarıldı ve tüpler numaralandırıldı. Yaş doku ağırlıkları ve ilave edilen tampon miktarları kaydedildi. Elde edilen homojenattan MPO enzim aktivite tayini yapıldı.

Bu işlemlerin sonunda doku homojenatları, süpernatantları ve ekstratları yedeklenerek -80° C'de saklandı.

3.2.4.2. Numunelerde Protein Tayini

Protein tayini Lowry'nin metodu kullanılarak yapıldı (121). Bu metoda göre; alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak Folin-Ciocalteu-Phenol reaktifini redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Buradaki rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kullanılan reaktifler;

Phenol-Folin-Ciocalteu reaktifi,

Na₃Sitrat (Tri-sodyum Sitrat),

CuSO₄ (Copper (II) Sülfat),

Na₂CO₃ (Sodyum Karbonat),

NaOH (Sodyum Hidroksit).

3.2.4.3. Myeloperoksidaz Enzim Aktivitesinin Tayini

MPO aktivitesi spektrofotometrik olarak Wei ve arkadaşlarının metoduna göre ölçüldü (122). MPO enzim aktivitesi MPO aracılı H₂O₂ ile yapılan oksidasyon için substrat olarak 4-aminoantipyrine/phenol solüsyonu kullanılarak yapıldı.

Kullanılan reaktifler:

Phenol,

KPO₄ (Potasyum Fosfat) tamponu,

C₁₉H₄₂NBr (Hexadeyltrimethylammonium Bromide),

4-AAP (4-aminoantypine),

H₂O₂ (Hidrojen Peroksit).

3.2.4.4. Malondialdehit Miktarının Tayini

MDA miktarı Draper ve Hadley'in metoduna göre çalışıldı (123). Bu yöntemde, MDA ile Tiobarbitürik Asit (TBA) reaksiyonunun meydana getirdiği renk oluşumu spektrofotometrik ölçümle değerlendirildi.

Kullanılan reaktifler:

%0,675'lik TBA (Tiobarbitürik asit),

%10'luk TCA (Triklorasetikasit).

3.2.4.5. Nitrik Oksit Miktarının Tayini

NO düzeyinin tespiti Griess metoduyla yapılmıştır (124). Bu metotta total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirilir. pH'sı 9,7 olan glisin tamponunda bakır kaplı kadmiyum granülleri, deproteinize numune süpernatantı ile 90 dakika süreyle aralıklı karıştırılarak inkübe edilir. İnkübasyon sonunda nitratın tamamı nitrite redüklenmektedir. Üretilen total nitrit düzeyi, sülfanilamid ve N-naftiletilediamin diazotizasyon reaksiyonu ile oluşan pembe rengin 545 nm'de spektrofotometre cihazında okunmasıyla tespit edilir (125).

Kullanılan Reaktifler:

Glisin,

Sülfanilamid,

Kadmiyum granülleri,

NaOH (Sodyum Hidroksit),
HCL (Hidroklorik Asit),
NNDA (N-Napthylethylenediamine),
CuSO₄ (Copper (II) Sülfat),
H₂SO₄ (Sülfürik Asit),
ZnSO₄ (Çinko Sülfat).

3.2.4.6. Katalaz Enzim Aktivitesinin Tayini

CAT aktivitesi Aebi'nin metoduna göre çalışıldı (117). H₂O₂ 240 nm'de maksimum absorbands verir. Deney ortamına eklenen H₂O₂, CAT enzimi tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu ise kendini ultraviyole spektrumda absorbands azalması şeklinde göstermektedir. Absorbanstaki bu azalma CAT enziminin aktivitesi ile doğru orantı göstermektedir.

Kullanılan reaktifler;

Fosfat tamponu (pH 7.50 mM),

H₂O₂ (Hidrojen Peroksit)

3.2.4.7. Ksantin Oksidaz Enzim Aktivitesinin Tayini

XO aktivitesi Prajda ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (126). Bu metoda göre XO aktivitesi; numunede olduğu farzedilen XO'nun ortamdaki ksantinden ürik asit oluşturması prensibine dayanmaktadır.

Kullanılan Reaktifler:

Ksantin,

Fosfat Tamponu (50 mM, PH: 7.5),

TCA%100 (Trikloroasetik Asit%100),

Na₂EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium).

3.2.4.8. Glutatyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Tayini

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (127). Glutatyon peroksidaz, H_2O_2 varlığında redükte glutatyonun (GSH), okside glutatyon (GSSG)'a yükseltgenmesini katalizlemektedir. H_2O_2 'nin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutatyon redüktaz ve NADPH yardımı ile GSH'a indirgenir. GSH-Px aktivitesi NADPH'nin $NADP^{+}$ 'ya yükseltgenmesi esnasındaki absorbans düşüşünün 340 nm'de okunmasıyla hesaplanır.

Kullanılan Reaktifler:

Fosfat tamponu (50 mM, pH=7),

GSH redüktaz (Glutatyon Redüktaz),

Redükte GSH (Redükte Glutatyon),

NaN_3 (Sodyum Azid),

H_2O_2 (Hidrojen Peroksit),

NADPH (β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate),

EDTA-Na tuzu (Ethylenediaminetetraacetic acid sodyum tuzu).

3.2.4.9. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesinin Tayini

Total süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre çalışıldı (128). Bu metod, ksantin/ ksantin oksidaz sistemiyle üretilen süperoksit radikalının Nitro Blue Tetrazoliumu (NBT) indirgemesi prensibine dayanmaktadır. Oluşan süperoksit radikalleri ortamdaki NBT'yi indirgeyerek renkli formazon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de en fazla absorbansı verir. Enzim bulunmayan ortamda indirgenme oluşup mavi-mor ren oluşmakta, ortamda SOD bulunduğunda indirgenme olmayarak enzimin miktarı ve aktivitesiyle ilişkili şekilde açık renk izlenmektedir.

Kullanılan Reaktifler:

Ksantin,

EDTA-Na (Ethylenediaminetetraacetic acid sodium),

(NH₄)₂SO₄ (Amonyum Sülfat),

NBT (Nitroblue tetrazolium),

Na₂CO₃ (Sodyum Karbonat),

BSA (Bovine serum albumin),

XO (Ksantin oksidaz),

CuCl₂ (Copper (II) Klorid),

NaCN (Sodyum Siyanid).

3.2.5. Doku Örneklerinde Histokimyasal Çalışmalar

3.2.5.1. Doku Takip Çalışmaları, Kesitlerin Elde Edilmesi, Rutin Boyanması

En az 48 saat %10 nötral formalin solüsyonu içerisinde fiksasyonu sağlanan doku örnekleri, bir gece akan suda yıkama işlemine tâbi tutulduktan sonra sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

a) Suyun dokulardan uzaklaştırılması (Dehidratasyon)

Dokular dereceli alkollerde sırasıyla belirtilen sürelerde bekletildi.

Alkol derecesi	Süre
%50	1 saat bekletildi.
%70	1 saat bekletildi.
%80	1 saat bekletildi.
%90	1 saat bekletildi.
%96	1 saat bekletildi.
%100	1 saat bekletildi.
%100	1 saat bekletildi.
%100	1 saat bekletildi.

b) Şeffaflandırma

Ksilolde 5-15 dk (Her 5 dk da bir kontrol edilerek işlem sonlandırıldı).

c) Parafin Emdirme

Sıvı parafin (60 °C etüvde) 30 dk bekletildi.

Katı parafin (oda sıcaklığında)) 1 gece bekletildi.

d) Gömme

Sert parafin, içerisine gömülen dokularla bloklar halinde hazırlandı.

e) Kesit alma

Hazırlanan parafin bloklardan kızaklı mikrotom kullanılarak 2-4 mikron kalınlığında kesitler alındı.

f) Rutin boyama (H-E)

Histokimyasal değerlendirme için preparatlara Hematoksilen- Eozin ile rutin boyama yapıldı. Uygulanan boyama protokolü aşağıda belirtilmiştir.

<u>Yapılan işlem</u>	<u>Süre</u>
1. Deparafinizasyon	
(60°C etüvde)	45 dk bekletildi.
2. Ksilol I	20 dk bekletildi.
3. Ksilol II	20 dk bekletildi.
4. <u>Alkol derecesi</u>	
a) %96	10 dk bekletildi.
b) %90	10 dk bekletildi.
c) %80	10 dk bekletildi.
d) %70	10 dk bekletildi.
5. Distile Su	5 dk bekletildi.
6. Hematoksilen	3 dk bekletildi.
7. Çeşme suyu	5 dk bekletildi, sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.
8. Asit alkol	3-4 sn
9. Çeşme suyu	5 dk bekletildi, sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.
9. Eozin	2 dk bekletildi.

10. Çeşme suyu 5 dk sonra 2-3 tur akan suda yıkandı.
11. %70- %80- %90 alkol serisinden sırasıyla batır çıkar yaparak geçirildi.
12. Ksilol 1 gece bekletildi.
13. Kapatma (Entellan)

Boyanan örnekler Olympus CX21 FS tipi binoküler mikroskopta incelenerek değerlendirildi ve görüntüleme donanımı ile fotoğraflar elde edildi.

3.2.5.2. Değerlendirme

Kontrol ve deney gruplarına ait karaciğer ve böbrek doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler Abdel-Wahhab ve arkadaşlarının (129) yapmış oldukları skorlamaya göre değerlendirildi.

- (-) skor (negatif skor): hiçbir yapısal değişikliğin olmaması,
- (+) skor (1 pozitif skor): hafif derecede,
- (++) skor (2 pozitif skor): orta derecede,
- (+++) skor (3 pozitif skor): ciddi derecede yapısal değişikliği ifade etmektedir.

3.2.6. Doku Örneklerinde İmmunohistokimyasal Çalışmalar

3.2.6.1. Doku Takip Çalışmaları, Kesitlerin Elde Edilmesi

Fiksasyonu sağlanan dokulara yukarıda sayılan doku takip işlemleri sırasıyla uygulanarak dokular parafine gömüldü. Kızaklı mikrotom ile lizinli lama 2-3 µm kalınlığında seri kesitler alındı.

3.2.6.2. İmmunohistokimyasal Boyama

3.2.6.2.1. İmmunohistokimyasal Boyamada Kullanılan Kimyasalların Hazırlanışı

Primer (Çoğul Klonlu-Poliklonal) Antikor:

- iNOS (Rabbit Anti-iNOS antibody, Abcam), antikor dilüsyon solüsyonu ile 1:50 oranında sulandırıldı.

- **TNF- α** (Rabbit Anti-TNF- α antibody, Abcam), antikor dilüsyon solüsyonu ile 1:100 oranında sulandırıldı.

Sekonder antikor:

SensiTek Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody, hazır solüsyon şeklinde kullanıldı.

Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS; Phosphate Buffer Solution 25X):

Seyreltme çözeltisi olarak kullanıldı. 1500 ml distile suya 500 ml PBS karıştırılarak hazırlandı. Her boyama için taze solüsyon hazırlandı.

Sodyum Sitrat Solüsyonu (Citrate Buffer 10X):

450 ml distile suya 50 ml Citrate Buffer solüsyonu karıştırılarak hazırlandı. Her boyama için taze solüsyon hazırlandı.

Hidrojen Peroksit Solüsyonu (%3):

Hazır solüsyon şeklinde kullanıldı.

DAB (3, 3 diaminobenzidin) Kromojen:

Bu madde ikincil antikor olarak kullanılan Horseradish-peroksidaz enziminin substratı olarak kullanıldı. Üretici firmanın (Scytek) önerisine göre 125 ml substrat için 7,5 ml kromojen içerecek şekilde karıştırıldı. Her karışım kullanımından yaklaşık 20 dk önce taze olarak hazırlandı.

Zıt Boyama:

Zıt boyamada amaç dokudaki antijenik olmayan hücre ve hücre yapılarını boyamaktır. Zıt boyama için Hematoksilen kullanıldı.

3.2.6.2.2. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

Sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. 2-3 μ m kalınlığında elde edilen parafin kesitler etüvde 60°C etüvde 1 saat bekletildi.
2. Deparafinizasyon işlemi için Ksilol-1'de 10 dk, Ksilol-2'de 10 dk bekletildi.

3. Dehidratasyon işlemi için sırasıyla,
 - a. %100'lük alkolde 5 dk bekletildi.
 - b. %96'lık alkolde 5 dk bekletildi.
 - c. %90'lık alkolde 5 dk bekletildi.
 - d. %80'lik alkolde 5 dk bekletildi.
 - e. %70'lik alkolde 5 dk bekletildi.
4. İki ayrı PBS solüsyonunda 5'er dk bekletildi.
5. Antijen retrieval uygulaması için sitrat buffer tamponu içinde mikrodalga fırında 600W'da 2 dk ısıtıldı ve 20 dk +4°C'de soğumaya bırakıldı.
6. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
7. PAP Pen kalem ile polilizinli lamaların üzerindeki doku kesitlerinin etrafı çizildi. Bu işlem ileriki safhalarda da gerektikçe tekrarlandı.
8. Dokuların üzerini kaplayacak şekilde ve diğer dokularla karışmamasına dikkat edilerek nemli ortamda %3'lük H₂O₂ solüsyonu damlatıldı. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
9. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
10. Dokunun üzerini kapatacak şekilde Super Block damlatılarak 5 dk bekletildi.
11. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
12. Lamlardaki 1. kesitlere iNOS primer ab, 2. kesitlere TNF- α primer ab, 3. kesitlere kontrol amacıyla sekonder antikor damlatıldı. Lamlar nemli kabin içerisinde +4°C'de bir gece bekletildi.
13. Ertesi gün kesitler üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
14. Sekonder antikor (SensiTek Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody), dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 20dk bekletildi.
15. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
16. Dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde Streptavidin Horseradish Peroksidaz (SensiTek HRP) damlatıldı ve 20 dk bekletildi.

17. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
18. DAB Kromojen solüsyonu, dokuların üzerine damlatıldı ve reaksiyon vermesi için 10dk bekletildi.
19. Üç ayrı PBS solüsyonunda 3'er dk bekletildi.
20. Hematoksilen dokuların üzerini kaplayacak şekilde damlatılarak 30 sn bekletildi.
21. Çeşme suyunda 5 dk yıkandı.
22. Sırasıyla %70, %80, %90 ve %100'lük alkol serilerinden batır çıkar yapılarak geçirildi.
23. Kesitler şeffaflaşana kadar ksilolde bekletildi.
24. Entellan kullanılarak kapama yapıldı.

Boyanan örnekler binoküler mikroskopta incelenip değerlendirildi ve görüntüleme donanımı ile fotoğraflar elde edildi.

3.2.6.3. Değerlendirme

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan karaciğer doku kesitlerindeki iNOS ve TNF- α reseptör yoğunluklarının belirlenmesinde, yarı nitel değerlendirme yöntemi kullanıldı (130). Bunun için şu derecelendirme ölçütüne başvuruldu:

- (-): Boyanma yok
- (-/ +): Çok hafif boyanma
- (+): Az boyanma
- (++): Orta derecede boyanma
- (+++): Yoğun şekilde boyanma

3.2.7. İstatistiksel Analizler

İstatistikler, Windows® uyumlu SPSS® 16.0 programı ile yapıldı. Kan örneklerinden elde edilen biyokimyasal bulguların ve histokimyasal bulguların analizinde gruplar nonparametrik testlerden “Kruskal-Wallis testi” ile karşılaştırıldı

ve iki grup arasındaki ölçüm değerlerinin karşılaştırılmasında “Mann – Whitney U testi” kullanıldı. Anlamlılık değeri $P<0,05$ olarak alındı. Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Doku örneklerinden elde edilen bulguların analizinde ise gruplar nonparametrik testlerden “one-way ANOVA testi” ile karşılaştırıldı ve gruplar arası anlamlılık Post Hoc testlerden “LSD (Least Significant Difference)” ile yapıldı. Anlamlılık değeri $P<0,05$ olarak alındı. Değerler, ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1. Deney Sonunda Rat Sayısı

Deneyin 3. günü kombine tedavi grubundan 2 rat, 7. günü 5 rat, 9. günü 1 rat olmak üzere toplam 8 rat öldü. PTX tedavi grubundan, 9. gün 1 rat öldü. ALA tedavi grubundan, deneyin 9. günü 3 rat, 10. günü 1 rat olmak üzere toplam 4 rat öldü. Ölümler tedavi gruplarında görülmekle birlikte; en fazla kombine tedavi grubunda görülürken en az PTX'le tedavi grubunda görüldü ve ratların kilosu ile ilişkili bir korelasyon göstermemektedir.

4.2. Kan Örneklerinde Biyokimyasal Bulgular

Çalışmamızda oluşturulan 5 gruba ait rat kanlarından elde edilen serum örneklerinde ölçülen ALT, AST, ALP, GGT enzim düzeyleri ve TBil, DBil, BUN, Üre, Cr düzeyleri tablo 2'de gösterilmiştir. Gruplar arasındaki değerlerde istatistiksel anlamlılık gösterenler de ($p<0,05$) bu tabloda gösterilmiştir.

AST enzim düzeyleri en yüksek Kontrol grubunda gözlemlendi. Kontrol grubuna göre; MTX grubunda da istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalma saptanırken, MTX+PTX grubu ($p=0,016$) başta olmak üzere MTX+ALA grubunda ($p=0,028$) da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptandı.

ALT enzim düzeyleri en yüksek Kontrol grubunda gözlemlendi. Kontrol grubuna göre; istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde en fazla azalma MTX+ALA grubunda olurken, en az azalma MTX grubunda saptandı.

ALP enzim düzeyleri yüksek Kontrol grubunda gözlemlendi. Kontrol grubuna göre; diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gözlenirken, en fazla azalma MTX+ALA grubundayken ($p=0,005$), en az azalma MTX grubunda ($p=0,002$) saptandı.

GGT enzim düzeylerinde kontrol grubuna göre; istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde en fazla azalma MTX grubunda olurken, en az azalma MTX+ALA grubunda saptandı.

Total bilirübin düzeylerinde kontrol grubuna göre; MTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir düşme, MTX+PTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde bir düşme, MTX+ALA grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde bir artma mevcuttu. Direk bilirübin düzeyleri ise kontrol grubuna göre; MTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde bir düşme, MTX+ALA grubunda ($p=0,030$) ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir artma görülürken; MTX+PTX grubunda ise kontrol seviyesinde kalmıştır.

BUN düzeyleri en yüksek MTX grubunda görülürken, kontrol grubuna göre; MTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artma saptanırken, istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde en fazla azalma MTX+ALA grubunda, en az azalma MTX+PTX grubunda saptandı. BUN değerleri MTX grubuna göre; MTX+ALA grubu ($p=0,028$) başta olmak üzere MTX+PTX ($p=0,028$) grubunda da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptandı.

Üre düzeyleri en fazla MTX grubunda gözlenirken, kontrol grubuna göre; MTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artma saptanırken, istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde en fazla azalma MTX+ALA grubunda, en az azalma MTX+PTX grubunda saptandı. Üre değerlerinde MTX grubuna göre; MTX+ALA ($p=0,034$) başta olmak üzere MTX+PTX grubunda da azalma saptandı.

Kreatinin düzeyleri kontrol grubuna göre; MTX grubu ve MTX+ALA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalma saptanırken, MTX+PTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artma saptandı.

Tablo 2. Rat Kan Örneklerinde AST, ALT, ALP, GGT enzim düzeyleri, TBil, DBil, BUN, Üre, Cr Düzeyleri

Parametreler	Grup I Kontrol	Grup II MTX	Grup III MTX+PTX	Grup IV MTX+ALA
AST (U/L)	107,62 ± 19,97	95,15 ± 30,23	81,45 ± 17,74 ^b	86,43 ± 10,49 ^b
ALT (U/L)	62,31 ± 23,12	53,40 ± 21,90	52,88 ± 17,55	50,28 ± 9,68
ALP (U/L)	207,51 ± 73,3	94,82 ± 46,59 ^b	93,14 ± 30,99 ^b	81,56 ± 28,11 ^b
GGT (U/L)	1,87 ± 0,52	1,33 ± 0,50	1,53 ± 0,52	1,60 ± 0,58
TBil (mg/dl)	0,02 ± 0,02	0,00 ± 0,01 ^b	0,01 ± 0,03	0,04 ± 0,01 ^{ce}
DBil (mg/dl)	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,00	0,08 ± 0,01 ^{ac}
BUN (mg/dl)	22,08 ± 2,15	27,00 ± 3,72	19,83 ± 5,43 ^d	18,63 ± 5,74 ^d
Üre (mg/dl)	46,66 ± 3,98	53,50 ± 7,16	42,43 ± 11,66 ^d	39,86 ± 12,30 ^d
Cr (mg/dl)	0,52 ± 0,04	0,48 ± 0,06	0,58 ± 0,15	0,50 ± 0,06

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir.

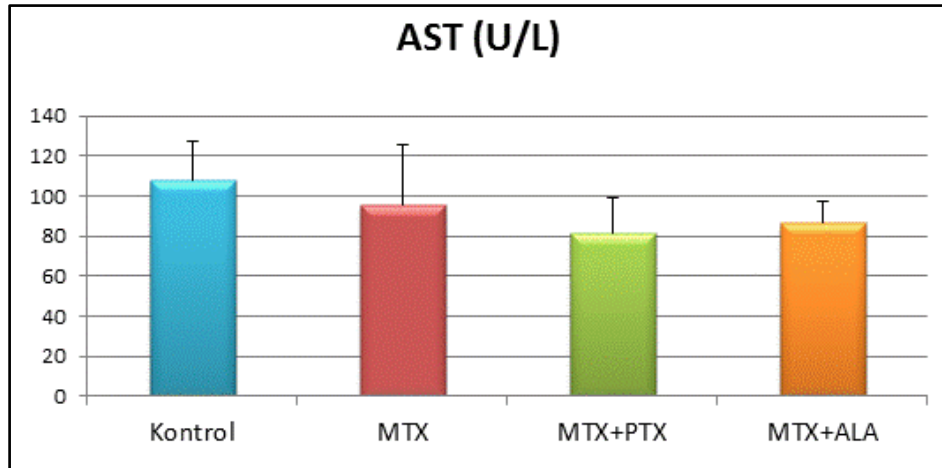
^a Kontrol grubuna göre anlamlı artma (p<0,05)

^b Kontrol grubuna göre anlamlı azalma (p<0,05)

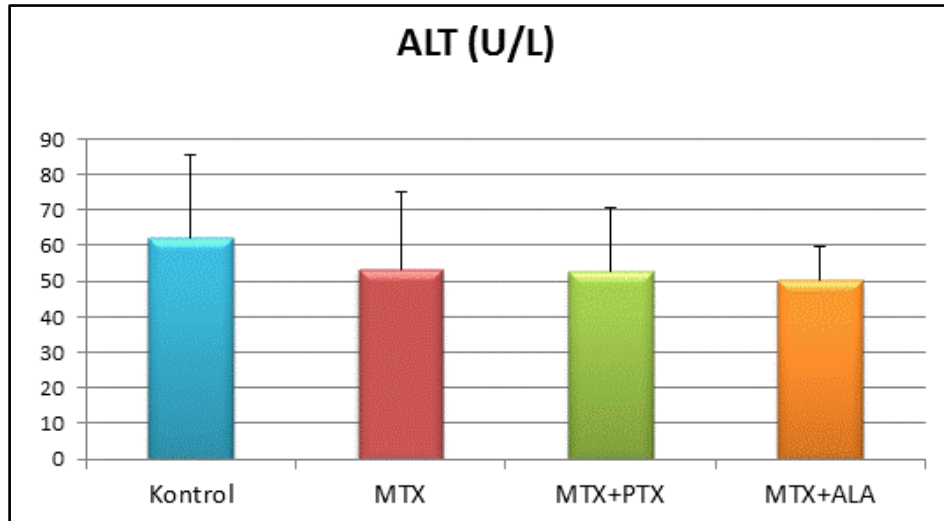
^c MTX grubuna göre anlamlı artma (p<0,05)

^d MTX grubuna göre anlamlı azalma (p<0,05)

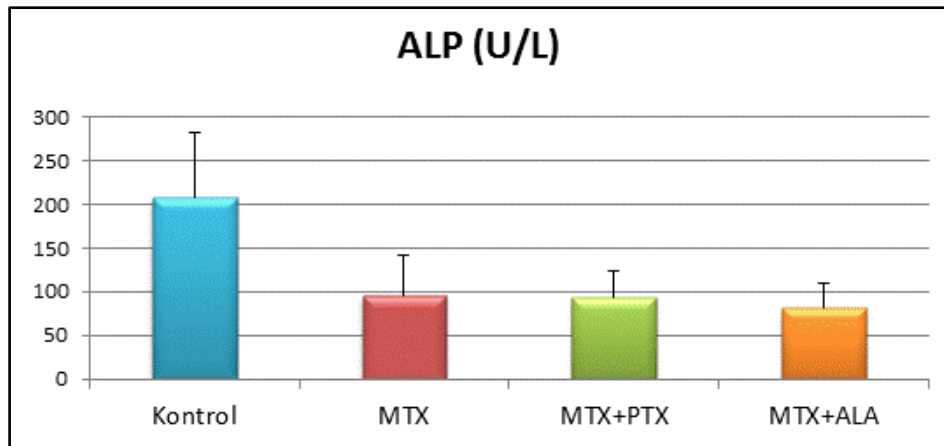
^e MTX+PTX grubuna göre anlamlı artma (p<0,05)



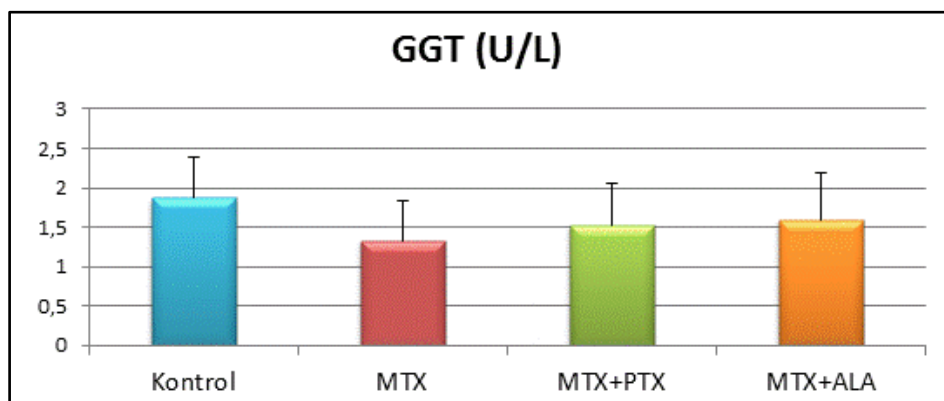
Grafik 1. Gruplara ait serum AST düzeylerinin karşılaştırılması



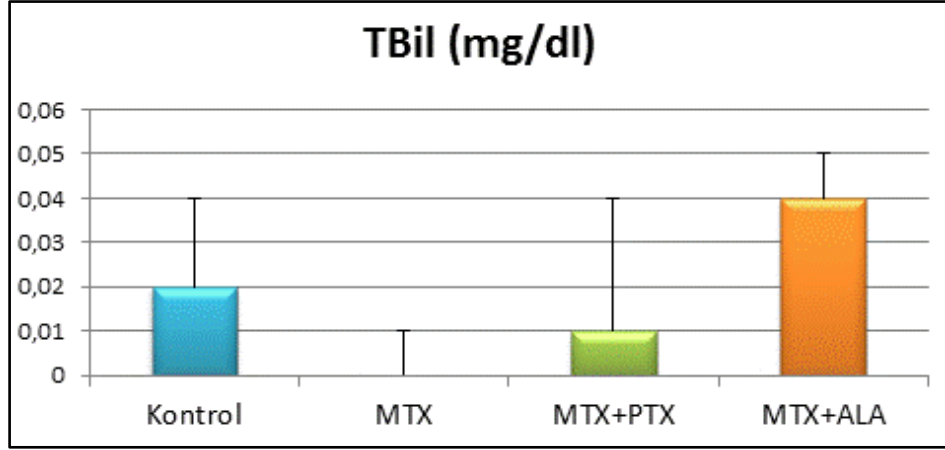
Grafik 2. Gruplara ait serum ALT düzeylerinin karşılaştırılması



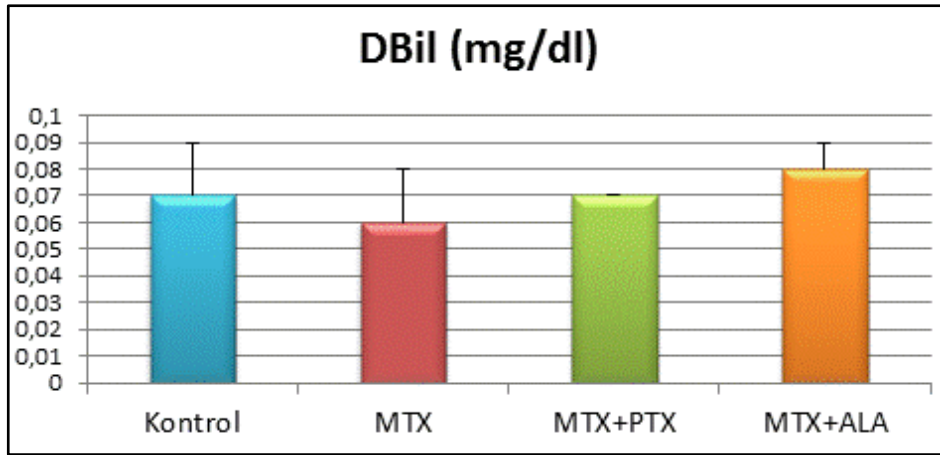
Grafik 3. Gruplara ait serum ALP düzeylerinin karşılaştırılması



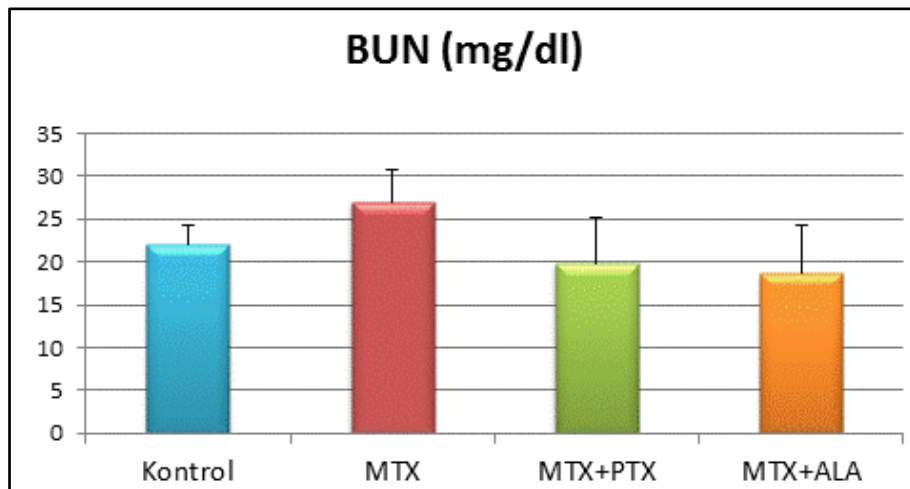
Grafik 4. Gruplara ait serum GGT düzeylerinin karşılaştırılması



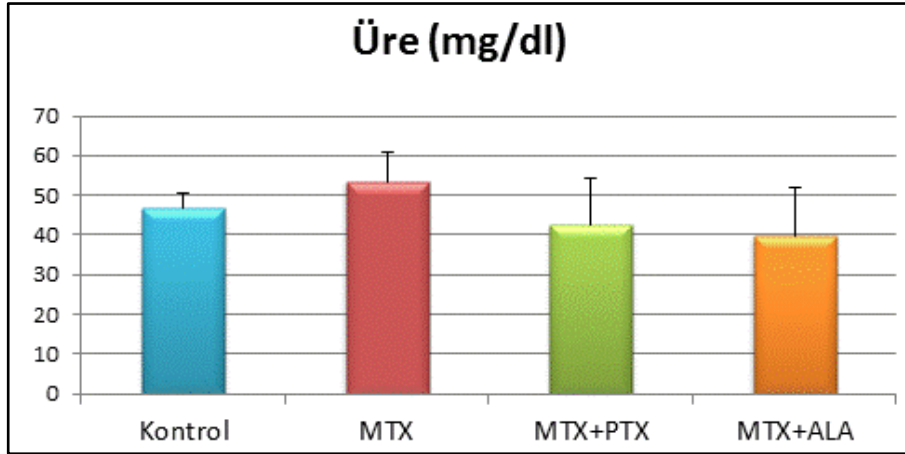
Grafik 5. Gruplara ait serum TBil düzeylerinin karşılaştırılması



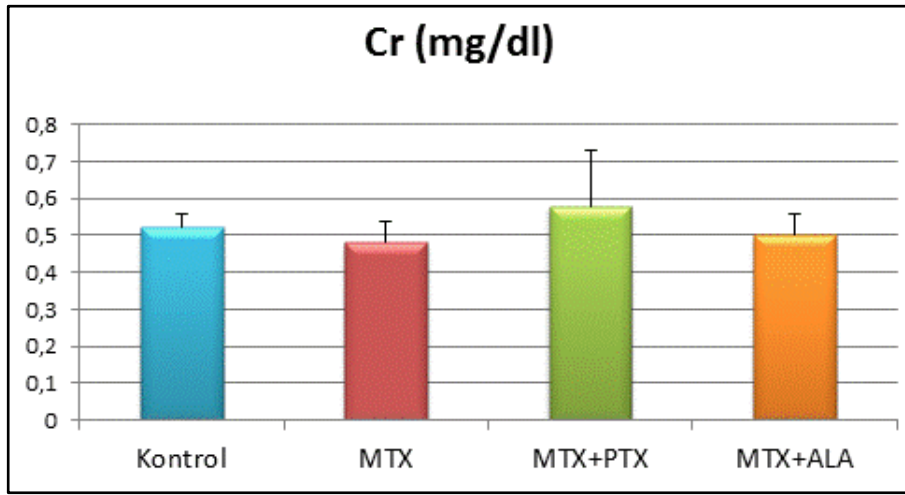
Grafik 6. Gruplara ait serum DBil düzeylerinin karşılaştırılması



Grafik 7. Gruplara ait serum BUN düzeylerinin karşılaştırılması



Grafik 8. Gruplara ait serum Üre düzeylerinin karşılaştırılması



Grafik 9. Gruplara ait serum Cr düzeylerinin karşılaştırılması

4.3. Doku Örneklerinde Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. Karaciğer Doku Örneklerinde Biyokimyasal Bulgular

Çalışmamızda oluşturulan 5 gruba ait rat karaciğer dokusu, SOD, CAT, GSH-Px, XO, MPO enzim aktiviteleri, MDA ve NO düzeyleri toplu halde tablo 3'de gösterilmiştir. Gruplar arasındaki değerlerden istatistiksel anlamlılık gösterenler de ($p < 0,05$) bu tabloda gösterilmiştir.

SOD enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre; istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde en fazla artış MTX grubunda olurken, MTX+ALA grubunda ise düzeyin çok değişmediği saptandı.

CAT enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre; istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde en fazla artış MTX grubunda olurken, en az artış MTX+ALA grubunda saptandı.

GSH-Px enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre; MTX+PTX ($p=0,001$), MTX+ALA ($p=0,001$) grubunda daha fazla olmak üzere, MTX ($p=0,008$) grubunda da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma saptandı.

MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre; MTX grubu ($p=0,001$) daha fazla olmak üzere MTX+PTX grubunda da ($p=0,013$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma saptanırken, MTX+ALA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artış saptandı. MDA düzeylerinde MTX grubuna göre; MTX+ALA grubu ($p=0,001$) başta olmak üzere MTX+PTX grubunda da ($p=0,003$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptandı.

NO düzeylerinde kontrol grubuna göre; MTX grubunda ($p=0,009$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma saptanırken, MTX+PTX grubu ve MTX+ALA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artış saptandı. NO düzeyleri MTX grubuna göre; MTX+PTX ($p=0,035$) grubu ve MTX+ALA ($p=0,017$) grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptandı.

XO enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre; istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde en fazla artış MTX grubunda olurken, en az artış MTX+ALA grubunda saptandı. MTX+PTX grubunda Kontrol grubuna göre; istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalma saptanırken, MTX grubuna göre ($p=0,032$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptandı.

MPO enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre; MTX grubunda ($p=0,025$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma saptanırken, MTX+PTX grubu ve MTX+ALA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artış saptandı.

Tablo 3. Rat karaciğer doku örneklerinde Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutatyon Peroksidaz, Ksantin Oksidaz, Myeloperoksidaz enzim aktiviteleri, Malondialdehit ve Nitrik Oksit seviyeleri

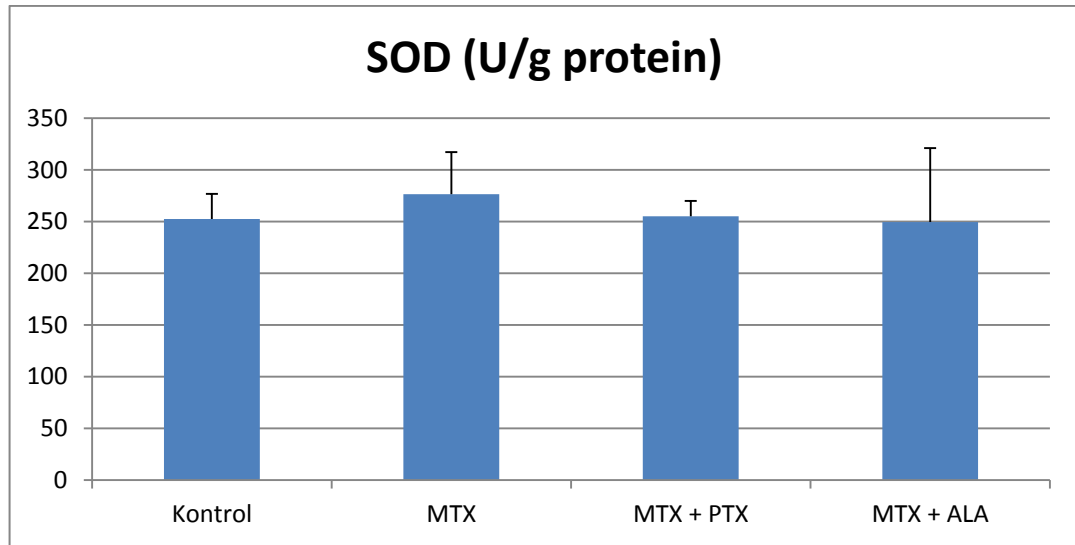
Parametreler	Grup I Kontrol	GrupII MTX	Grup III MTX+PTX	Grup IV MTX+ALA
SOD (U/g protein)	252,525 ± 24,347	276,442 ± 40,730	255,077 ± 14,854	249,608 ± 71,439
CAT (k/g protein)	1,790 ± 0,829	2,585 ± 1,178	2,355 ± 0,521	2,085 ± 0,536
GSH-Px (U/g protein)	0,037 ± 0,007	0,055 ± 0,017 ^a	0,066 ± 0,010 ^a	0,063 ± 0,014 ^a
MDA (nmol/g protein)	5,824 ± 1,069	9,867 ± 1,497 ^a	7,696 ± 1,510 ^{ab}	6,937 ± 1,725 ^b
NO (µmol/g protein)	0,119 ± 0,011	0,145 ± 0,029 ^a	0,125 ± 0,014 ^b	0,120 ± 0,012 ^b
XO (U/g protein)	1,659 ± 0,373	2,040 ± 0,414	1,568 ± 0,567 ^b	1,885 ± 0,437
MPO (U/g protein)	0,056 ± 0,016	0,067 ± 0,007 ^a	0,062 ± 0,004	0,064 ± 0,005

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir.

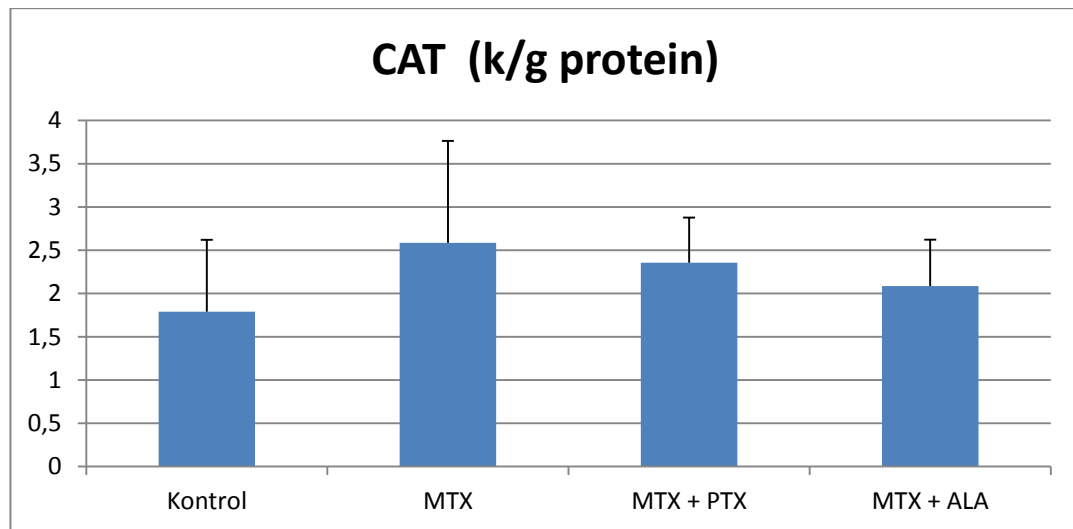
^a Kontrol grubuna göre anlamlı derecede artma var (p<0,05)

^b MTX grubuna göre anlamlı derecede azalma var (p<0,05)

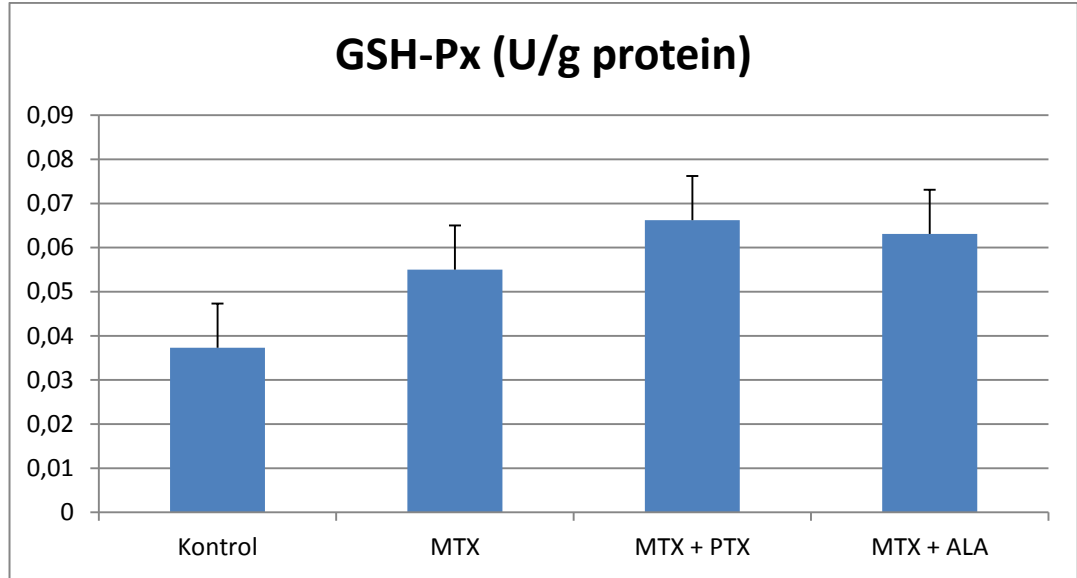
MTX: Metotreksat, PTX: Pentoksifilin, ALA: α-Lipoik asit



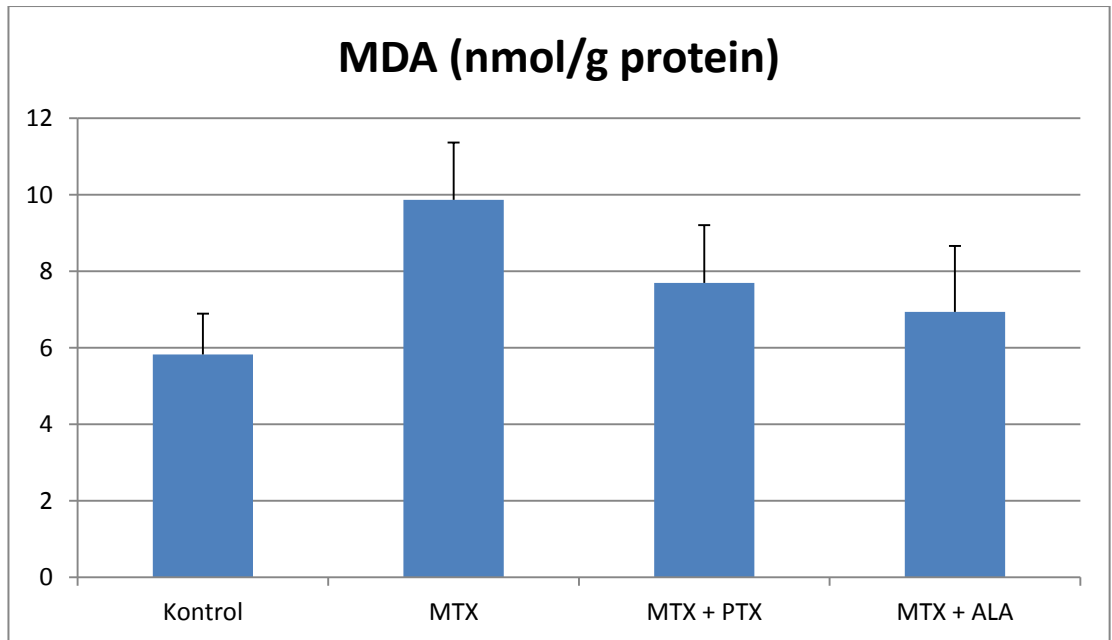
Grafik 10. Gruplara ait karaciğer dokusunun SOD aktivitelerinin karşılaştırılması



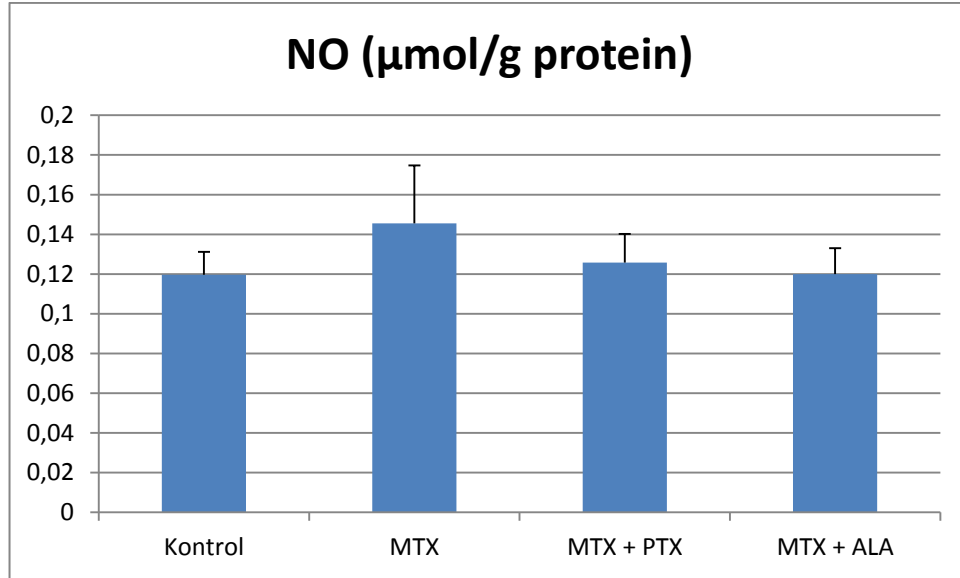
Grafik 11. Gruplara ait karaciğer dokusunun CAT aktivitelerinin karşılaştırılması



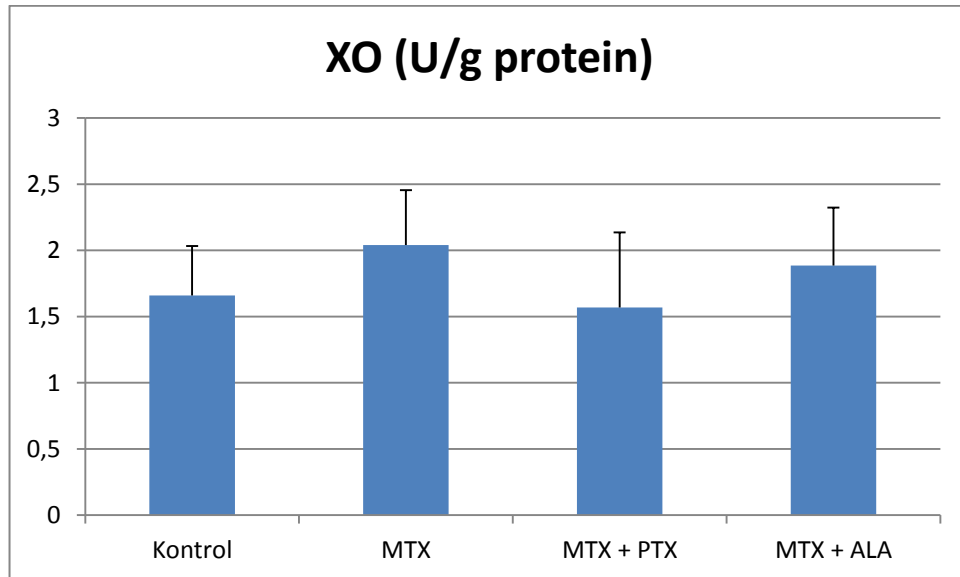
Grafik 12. Gruplara ait karaciğer dokusunun GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması



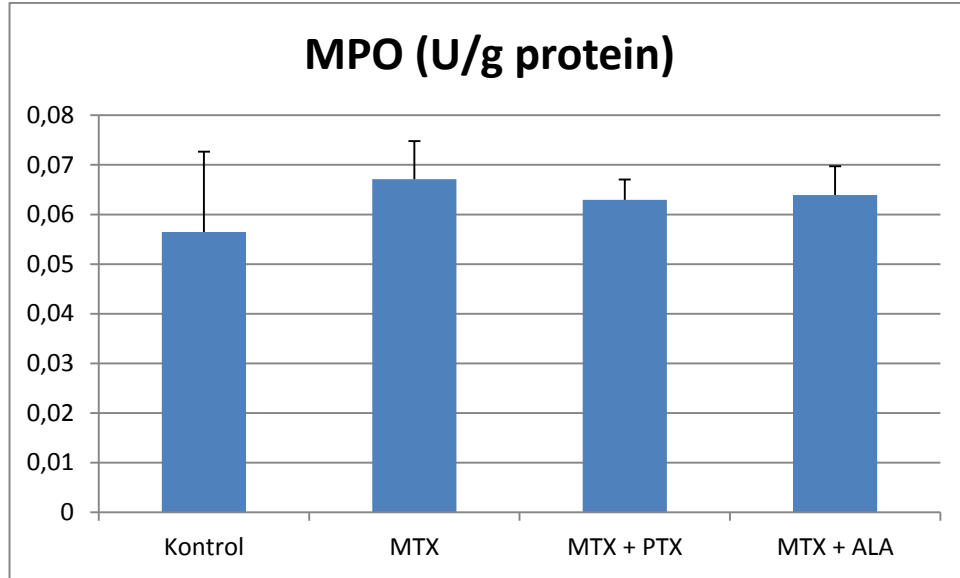
Grafik 13. Gruplara ait karaciğer dokusunun MDA düzeylerinin karşılaştırılması



Grafik 14. Gruplara ait karaciğer dokusunun NO düzeylerinin karşılaştırılması



Grafik 15. Gruplara ait karaciğer dokusunun XO aktivitelerinin karşılaştırılması



Grafik 16. Gruplara ait karaciğer dokusunun MPO aktivitelerinin karşılaştırılması

4.3.2. Böbrek Doku Örneklerinde Biyokimyasal Bulgular

Çalışmamızda oluşturulan 5 gruba ait rat karaciğer dokusu, SOD, CAT, GSH-Px, XO, MPO enzim aktiviteleri, MDA ve NO düzeyleri toplu halde tablo 4’de gösterilmiştir. Gruplar arasındaki değerlerden istatistiksel anlamlılık gösterenler ($p < 0,05$) bu tabloda gösterilmiştir.

SOD enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre; tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artış görülürken; en fazla artış MTX+ALA grubundaydı. MTX grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalma saptandı.

CAT enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre; diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde görülürken; en fazla artış MTX grubunda, en az artış MTX+ALA grubunda saptandı.

GSH-Px enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre; MTX ($p=0,020$) grubunda da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptanırken; MTX grubuna göre; tedavi gruplarında başta MTX+ALA ($p=0,021$) olmak üzere MTX+PTX ($p=0,008$), grubunda da istatistiksel olarak anlamlı bir artma saptandı.

MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre; MTX grubu ($p=0,001$) daha fazla olmak üzere MTX+ALA grubunda da ($p=0,012$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde

artma saptanırken, MTX+PTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artış saptandı. MDA düzeylerinde MTX grubuna göre; MTX+PTX grubunda ($p=0,003$) istatistiksel olarak anlamlı, MTX+ALA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalma saptandı.

NO düzeylerinde kontrol grubuna göre; başta MTX grubu olmak üzere diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artma saptanırken, MTX grubuna göre; özellikle MTX+ALA grubunda olmak üzere MTX+PTX grubunda da istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalma saptandı.

XO enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre; başta MTX grubu olmak üzere MTX+PTX grubunda da, istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artış olurken, MTX+ALA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalma saptandı. MTX grubuna göre; başta MTX+ALA olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalma saptandı.

MPO enzim aktivitesinde kontrol grubuna göre; diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanırken; en fazla azalma MTX+ALA ($p= 0,001$) grubunda, en az azalma MTX+PTX ($p= 0,001$) grubundaydı. MTX grubuna göre; MTX+ALA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalma varken, MTX+PTX grubunda artış sözkonusuydu.

Tablo 4. Rat böbrek doku örneklerinde Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutasyon Peroksidaz, Ksantin Oksidaz, Myeloperoksidaz enzim aktiviteleri, Malondialdehit ve Nitrik Oksit seviyeleri

Parametreler	Grup I Kontrol	Grup II MTX	Grup III MTX+PTX	Grup IV MTX+ALA
SOD (U/g protein)	224,283 ± 26,678	205,122 ± 32,977	227,172 ± 38,187	229,250 ± 27,800
CAT (k/g protein)	2,147 ± 0,378	2,642 ± 1,051	2,631 ± 0,408	2,231 ± 0,625
GSH-Px (U/g protein)	0,059 ± 0,183	0,045 ± 0,009 ^b	0,061 ± 0,006 ^c	0,060 ± 0,013 ^c
MDA (nmol/g protein)	8,104 ± 1,262	10,438 ± 0,629 ^a	8,988 ± 0,912 ^d	9,526 ± 1,120 ^a
NO (µmol/g protein)	0,083 ± 0,012	0,100 ± 0,025	0,096 ± 0,015	0,093 ± 0,016
XO (U/g protein)	1,130 ± 0,355	1,372 ± 0,314	1,227 ± 0,203	1,124 ± 0,209
MPO (U/g protein)	0,051 ± 0,014	0,024 ± 0,010 ^b	0,030 ± 0,006 ^b	0,022 ± 0,008 ^b

Sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak gösterilmiştir.

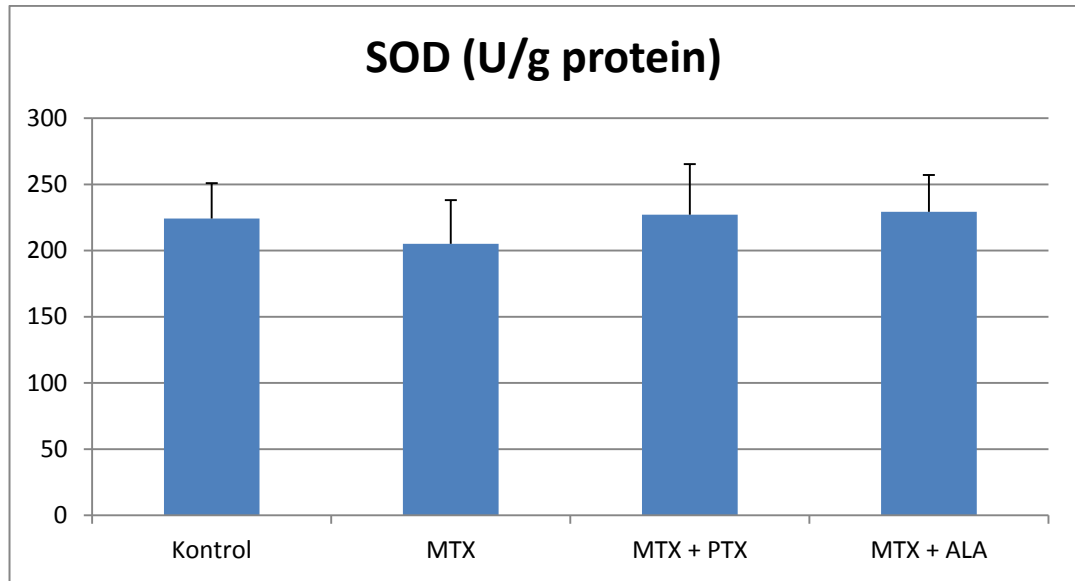
^a Kontrol grubuna göre anlamlı derecede artma var (p<0,05)

^b Kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma var (p<0,05)

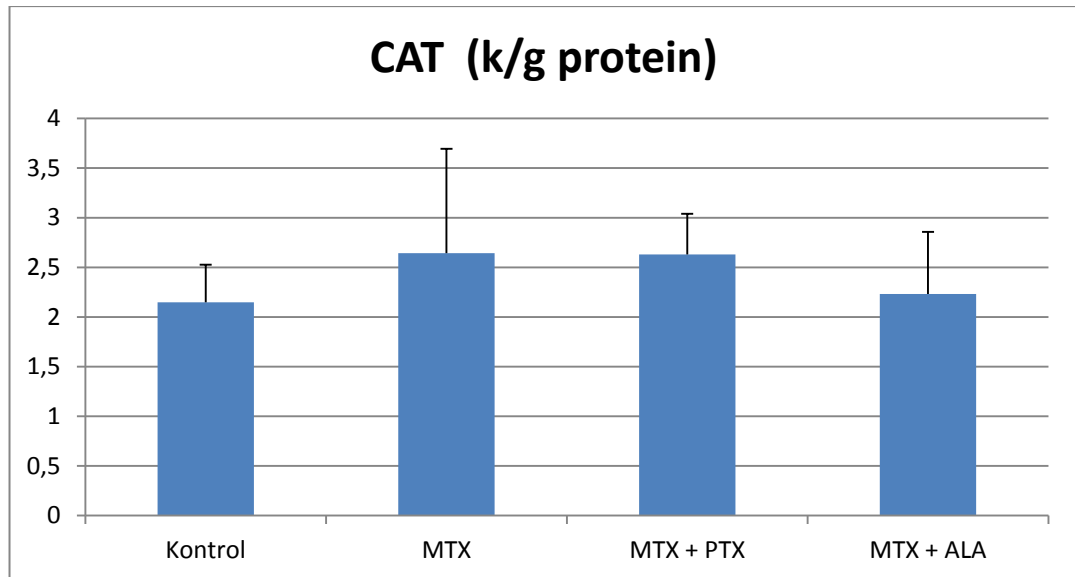
^c MTX grubuna göre anlamlı derecede artma var (p<0,05)

^d MTX grubuna göre anlamlı derecede azalma var (p<0,05)

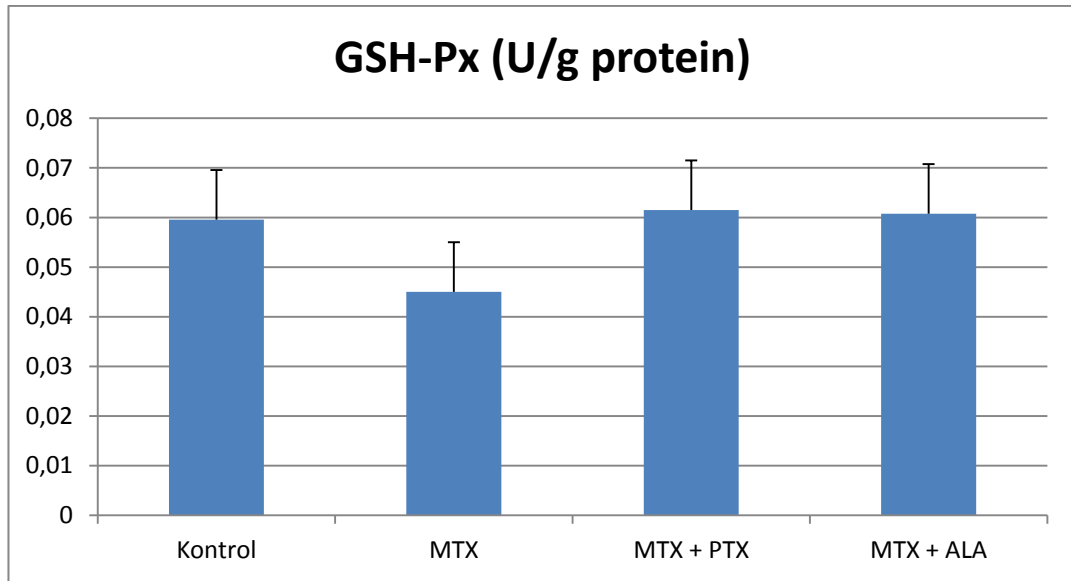
MTX: Metotreksat, PTX: Pentoksifilin, ALA: α-Lipoik asit



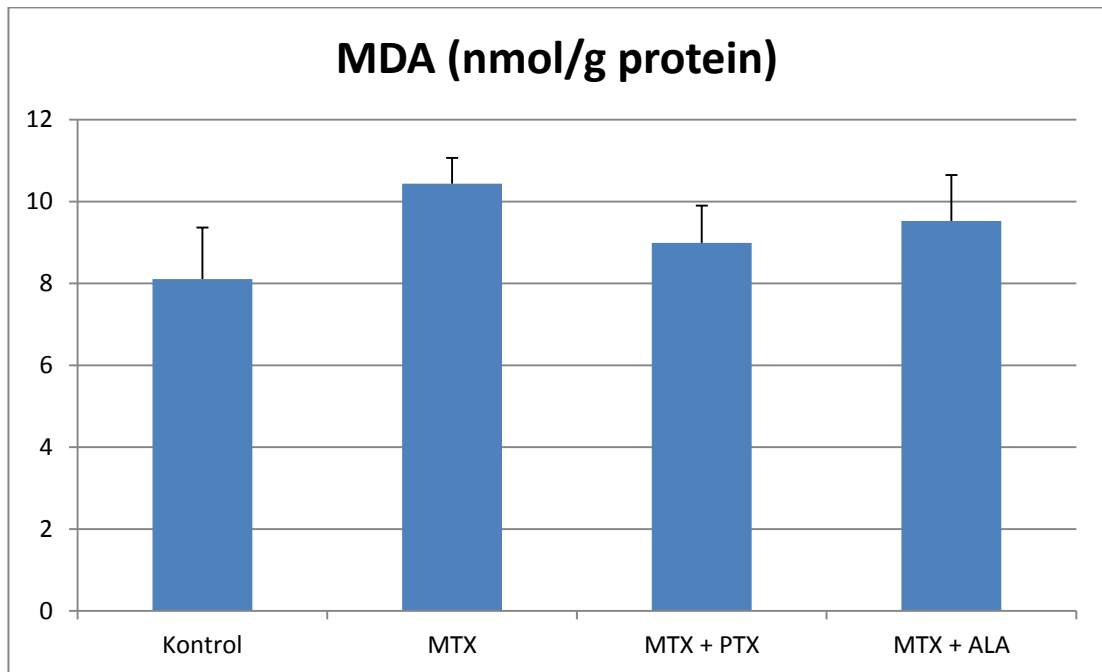
Grafik 17. Gruplara ait böbrek dokusunun SOD aktivitelerinin karşılaştırılması



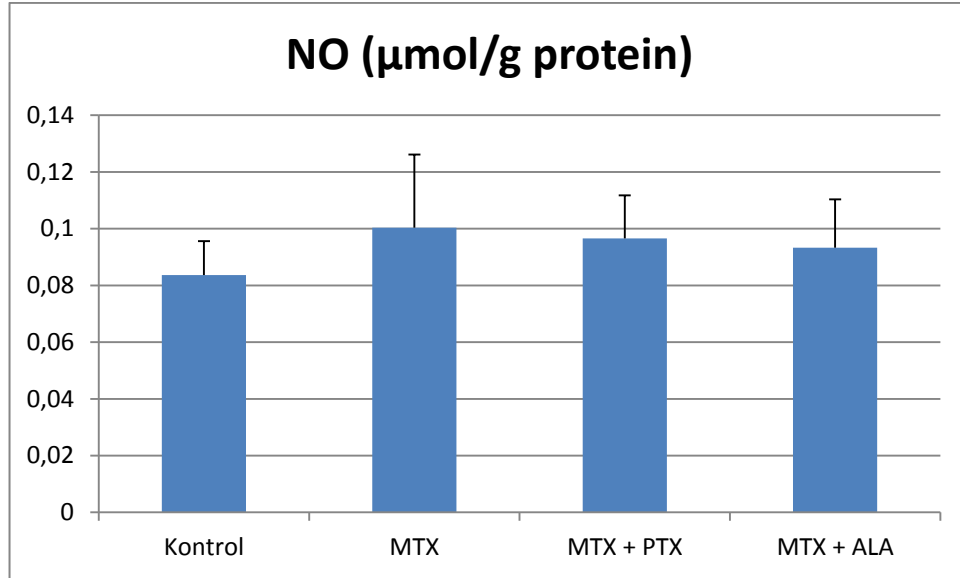
Grafik 18. Gruplara ait böbrek dokusunun CAT aktivitelerinin karşılaştırılması



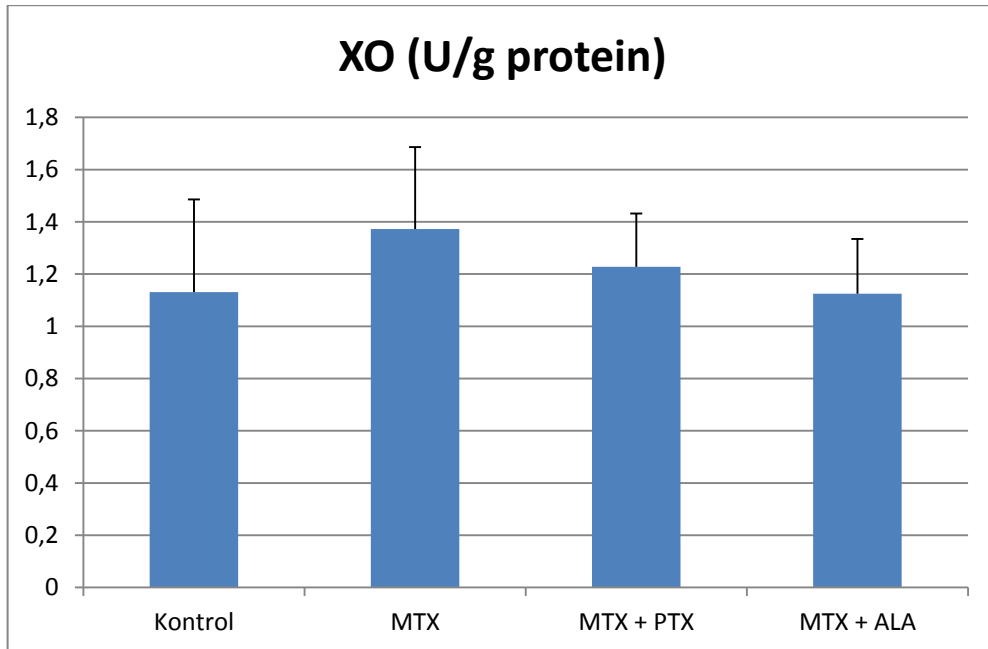
Grafik 19. Gruplara ait böbrek dokusunun GSH-Px aktivitelerinin karşılaştırılması



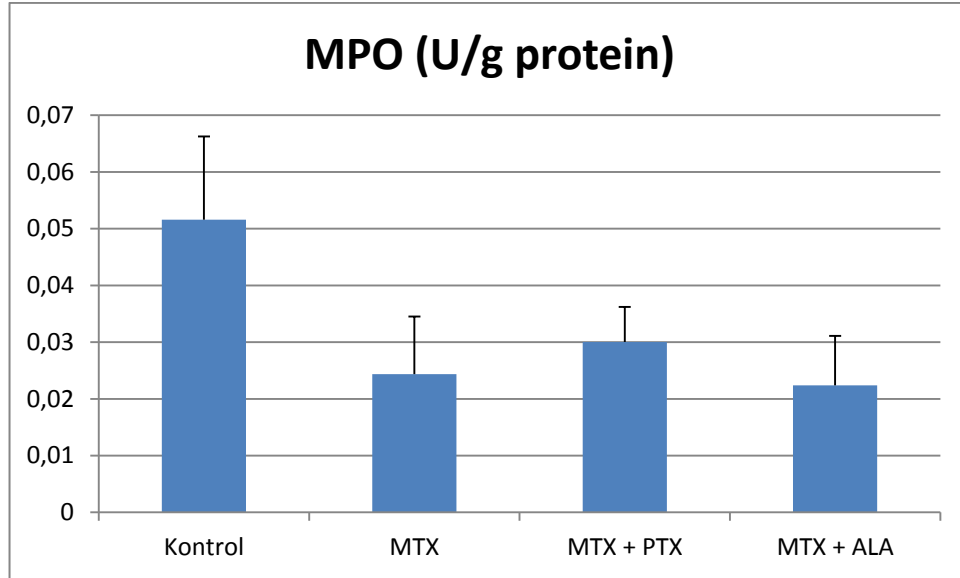
Grafik 20. Gruplara ait böbrek dokusunun MDA düzeylerinin karşılaştırılması



Grafik 21. Gruplara ait böbrek dokusunun NO düzeylerinin karşılaştırılması



Grafik 22. Gruplara ait böbrek dokusunun XO aktivitelerinin karşılaştırılması



Grafik 23. Gruplara ait böbrek dokusunun MPO aktivitelerinin karşılaştırılması

4.4. Doku Örneklerindeki Histokimyasal Bulgular

4.4.1. Karaciğer Doku Örneklerindeki Histokimyasal Bulgular

Kontrol ve deney gruplarına ait karaciğer doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler (129) ve p değerleri tablo 5’de, gruplar arasında gözlenen değişikliklerin p değerleri ise tablo 6’de verilmiştir.

Histokimyasal değerlendirmelerde, Kontrol grubuna ait sıçanların kc dokuları normal histolojik görünümde izlendi (Resim 1, Tablo 5). MTX grubundaki sıçanların karaciğer doku kesitleri incelendiğinde önemli histopatolojik değişiklikler gözlemlendi; hepatositlerde granüler dejenerasyon, portal alanda ve parankimde mononükleer hücre infiltrasyonları, sinüzoidal dilatasyon ve vasküler konjesyon belirgin bir şekilde izlenirken, hepatositlerde vakuoler dejenerasyon ve piknotik çekirdekler düşük düzeylerde izlendi (Resim2 ve 3, Tablo 5). Ayrıca portal alanda bağ dokusu artışı ve safra kanalı proliferasyonu mevcuttu.

MTX+ALA grubu grubuna ait sıçanların kc dokularında MTX grubuna göre histopatolojik bulgularda önemli ölçüde düzelme gözlemlendi (Resim 5, Tablo 5).

MTX+PTX grubu (Resim 4, Tablo 5) ve MTX+PTX+ALA grubunda (Resim 6, Tablo 5) MTX grubuna göre histopatolojik bulgularda gerileme gözlemlense de MTX+ALA grubundaki kadar belirgin düzelme gözlemlenmedi.

4.4.2. Böbrek Doku Örneklerindeki Histokimyasal Bulgular

Kontrol ve deney gruplarına ait böbrek doku kesitlerinde incelenen yapısal değişiklikler (129) ve p değerleri tablo 7’te, gruplar arasında gözlenen değişikliklerin p değerleri ise tablo 8’da verilmiştir.

Histokimyasal değerlendirmelerde, Kontrol grubuna ait sıçanların böbrek dokuları normal histolojik görünümde izlendi (Resim 7, Tablo 7). MTX grubundaki sıçanların böbrek doku kesitleri incelendiğinde önemli histopatolojik değişiklikler gözlemlendi; proksimal ve distal tübül epitel hücrelerinde belirgin hidropik dejenerasyon ve perivasküler ve intertübüler alanlarda önemli mononükleer hücre infiltrasyonları izlendi. Ayrıca vasküler ve glomeruler konjesyon, tübüler dilatasyon ve bazı glomerüllerde dejenerasyon gözlemlendi (Resim8 ve 9, Tablo 7).

MTX+ALA grubu grubuna ait sıçanların böbrek dokularında MTX grubuna göre histopatolojik bulgularda önemli ölçüde düzelme gözlemlendi (Resim 11, Tablo 7).

MTX+PTX grubu (Resim 10, Tablo 7) ve MTX+PTX+ALA grubunda (Resim 12, Tablo 7) MTX grubuna göre histopatolojik bulgularda gerileme gözlemlense de MTX + ALA grubundaki kadar belirgin düzelme gözlemlenmedi.

Tablo 6. Gruplar arasında karaciğer dokusunda gözlenen yapısal değişikliklerin Mann-Whitney U testine göre p değerleri

	Hepatositlerde granüler dejenerasyon	Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon	Hepatositlerde piknotik çekirdekler	Portal alanda ve parankimde mononükleer hücre infiltrasyonları	Safra kanalı proliferasyonu	Sinüzoidal dilatasyon	Vasküler Konjesyon
Grup I-II	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
Grup I-III	P<0,05	P<0,05	AD	P<0,05	AD	P<0,05	P<0,05
Grup I-IV	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
Grup I-V	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	AD	AD	P<0,05
Grup II-III	P<0,05	AD	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
Grup II-IV	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
Grup II-V	P<0,05	AD	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
Grup III-IV	P<0,05	P<0,05	AD	P<0,05	AD	P<0,05	P<0,05
Grup III-V	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
Grup IV-V	P<0,05	P<0,05	AD	P<0,05	AD	AD	AD

AD: Anlamlı Değil

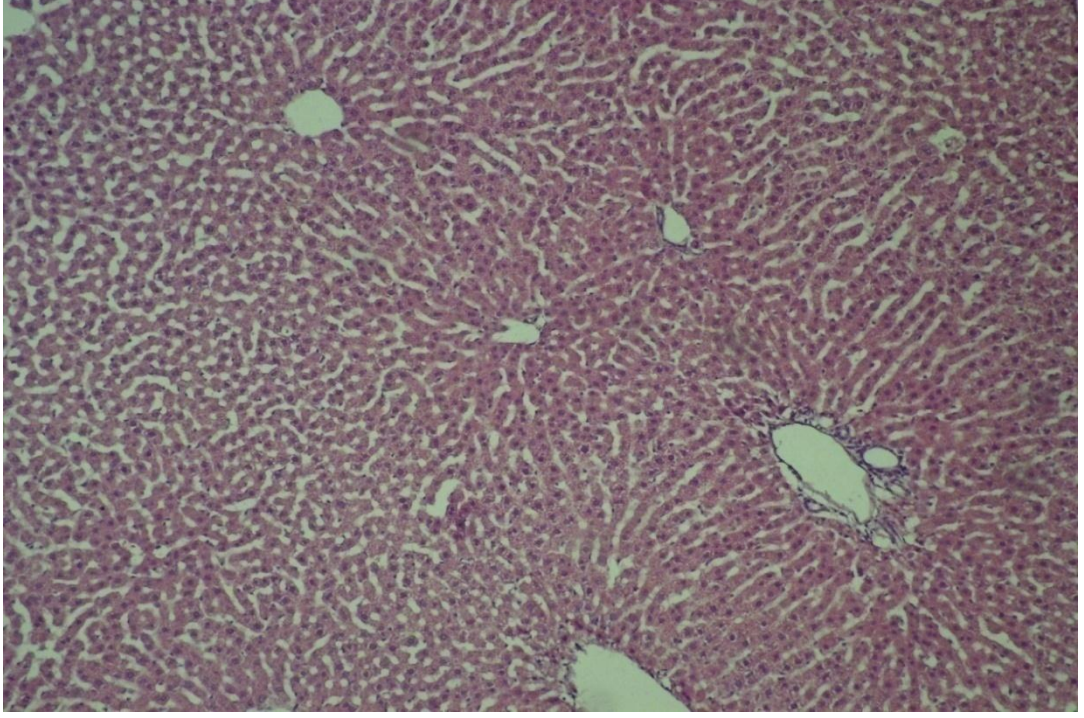
Tablo 7. Kontrol ve deney gruplarında böbrek dokusunda gözlenen yapısal değişiklikler ve Kruskal-Wallis p değerleri

Deney Grupları	Grup I (Kontrol)						Grup II (MTX)						Grup III (MTX+PTX)						Grup IV (MTX+ALA)						Grup V (MTX+PTX+ALA)						Kruskal- Wallis P Değerleri
	-	+	++	+++	Ort	-	+	++	+++	Ort	-	+	++	+++	Ort	-	+	++	+++	Ort	-	+	++	+++	Ort						
Parametreler/Skor	6	2	0	0	-	0	0	2	8	+++	Ort	0	1	5	0	++	Ort	0	6	3	0	+	0	2	0	++	Ort				
Glomerüler dejenereasyon	7	1	0	0	-	0	3	7	0	++	Ort	4	2	0	0	-	Ort	6	3	0	0	-	0	2	0	+	Ort				
Glomerüler konjesyon	8	0	0	0	-	0	0	3	7	+++	Ort	2	4	0	0	+	Ort	3	6	0	0	+	0	2	0	+	Ort				
Tübüllerde hidropik dejenereasyon	6	2	0	0	-	0	0	1	9	+++	Ort	0	0	5	1	++	Ort	4	5	0	0	+	0	2	0	++	Ort				
Tübüler dilatasyon	7	1	0	0	-	0	0	1	9	+++	Ort	1	4	1	0	+	Ort	4	5	0	0	+	0	2	0	+	Ort				
Mononükleer hücre infiltrasyonları	7	1	0	0	-	0	0	3	7	+++	Ort	0	2	4	0	++	Ort	4	5	0	0	+	0	2	0	++	Ort				
Kortikal Konjesyon	6	2	0	0	-	0	0	1	9	+++	Ort	1	1	4	0	++	Ort	4	5	0	0	+	0	2	0	++	Ort				
Medüller Konjesyon	7	1	0	0	-	0	0	3	7	+++	Ort	0	2	4	0	++	Ort	4	5	0	0	+	0	2	0	++	Ort				

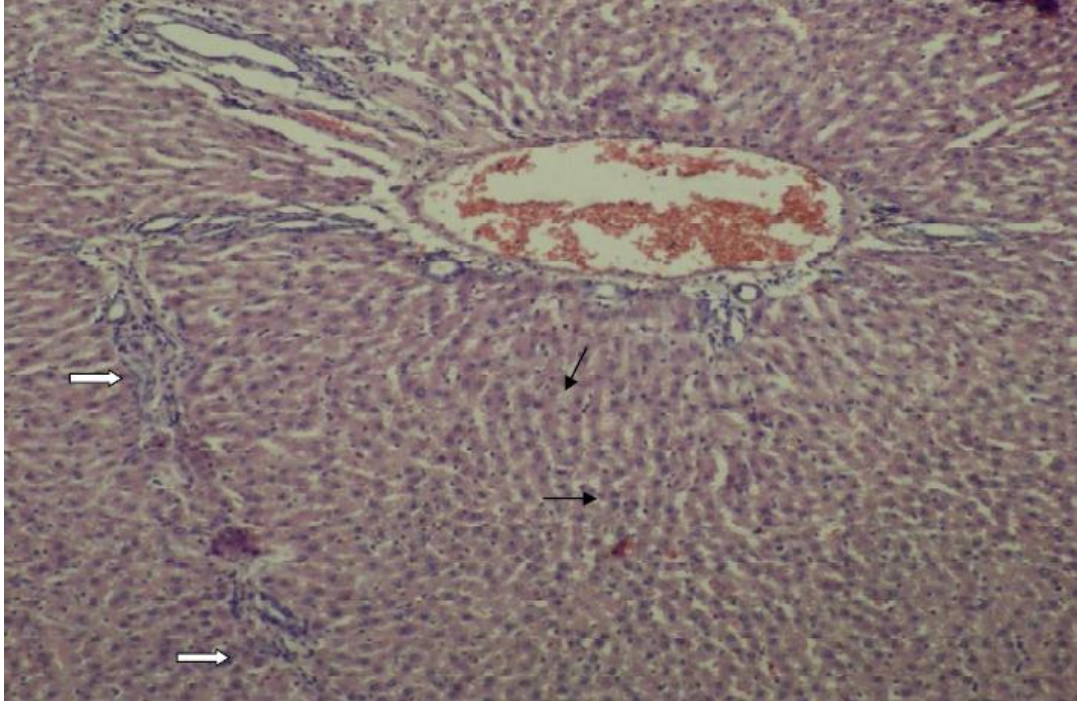
Tablo 8. Gruplar arasında böbrek dokusunda gözlenen yapısal değişikliklerin Mann-Whitney U Testine Göre p değerleri

	Glomerüler dejenerasyon	Glomerüler konjesyon	Tübüllerde hidropik dejenerasyon	Tübüler dilatasyon	Mononükleer hücre infiltrasyonları	Kortikal Konjesyon	Medüller Konjesyon
Grup I-II	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
Grup I-III	P<0,05	AD	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
Grup I-IV	P<0,05	AD	P<0,05	AD	AD	AD	P<0,05
Grup I-V	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
Grup II-III	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
Grup II-IV	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05	P<0,05
Grup II-V	P<0,05	AD	P<0,05	P<0,05	P<0,05	AD	P<0,05
Grup III-IV	AD	AD	AD	P<0,05	AD	P<0,05	AD
Grup III-V	AD	AD	AD	AD	AD	AD	AD
Grup IV-V	AD	AD	AD	P<0,05	AD	P<0,05	P<0,05

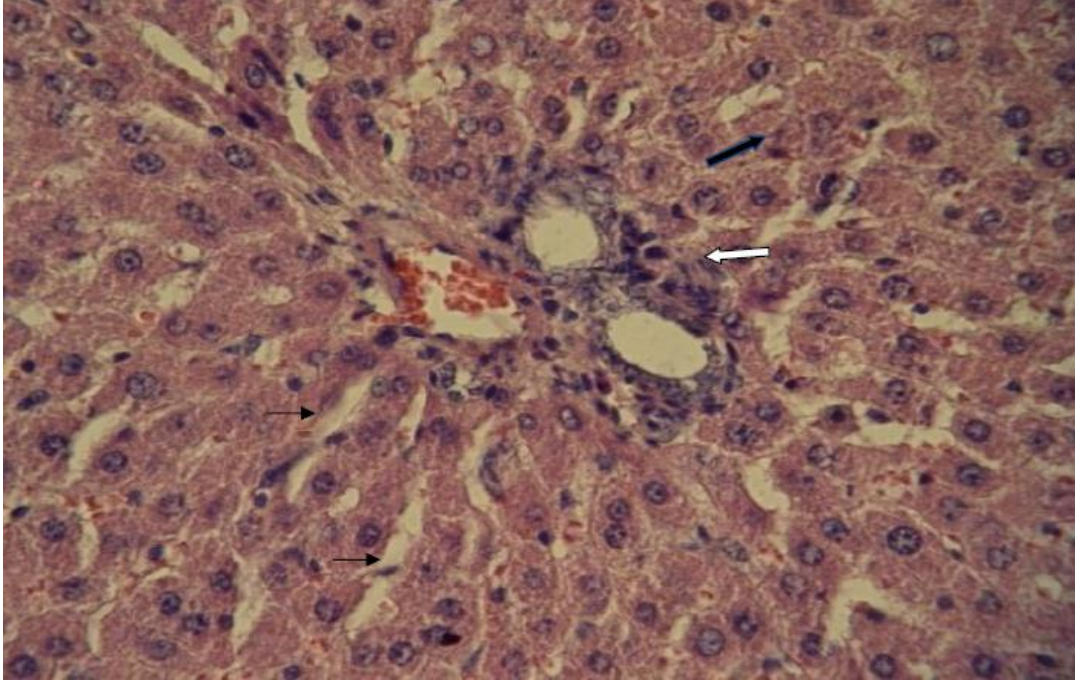
AD: Anlamlı değil



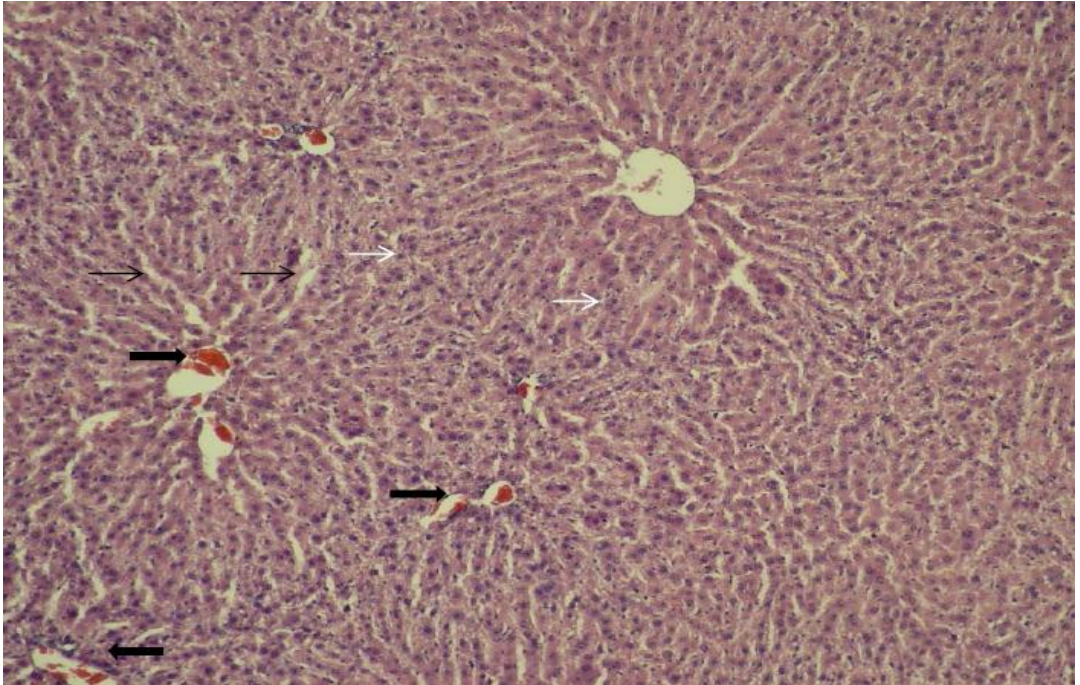
Resim 1. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (H-E, x10)



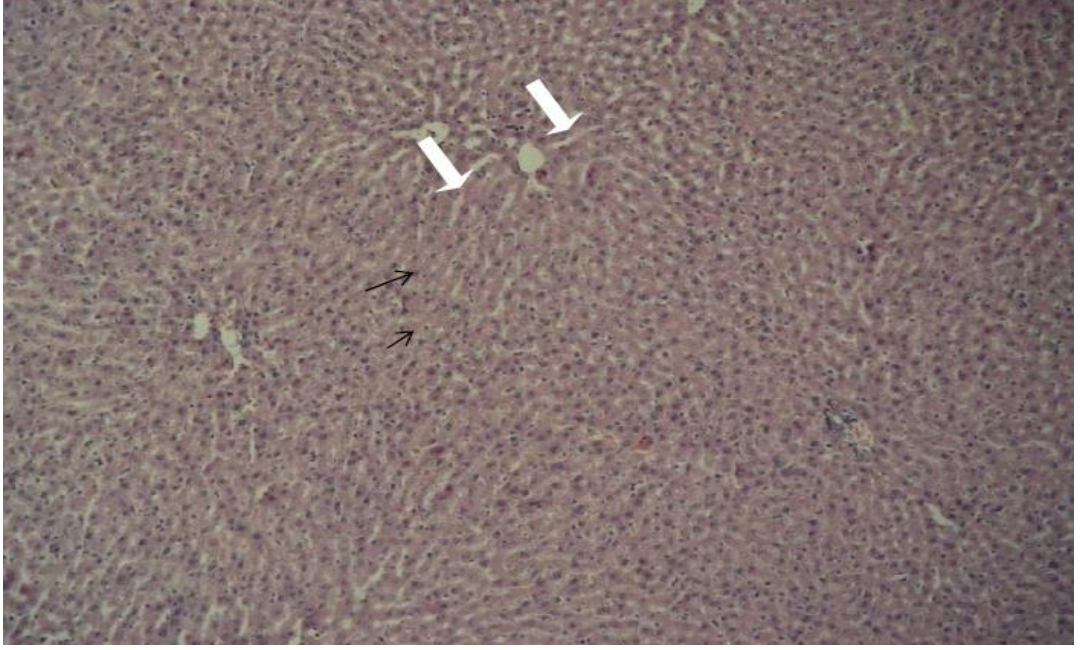
Resim 2. Metotrexat grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Parankimde mononükleer hücre infiltrasyonu (beyaz ok), piknotik çekirdek (siyah ok) gözlenmekte (H-E, x10).



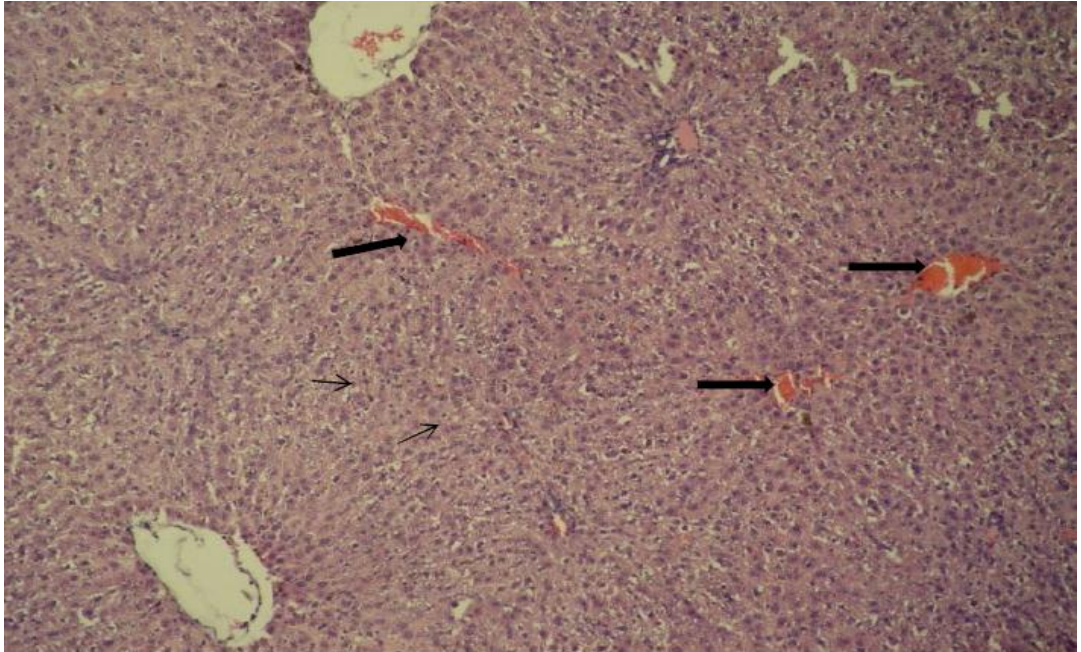
Resim 3. Metotrexat grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Hepatositlerde granüler dejenerasyon(siyah kalın ok), portal alanda mononükleer hücre infiltrasyonları (beyaz ok), sinüzoidal dilatasyon (siyah ince ok) gözlenmekte (H-E, x40).



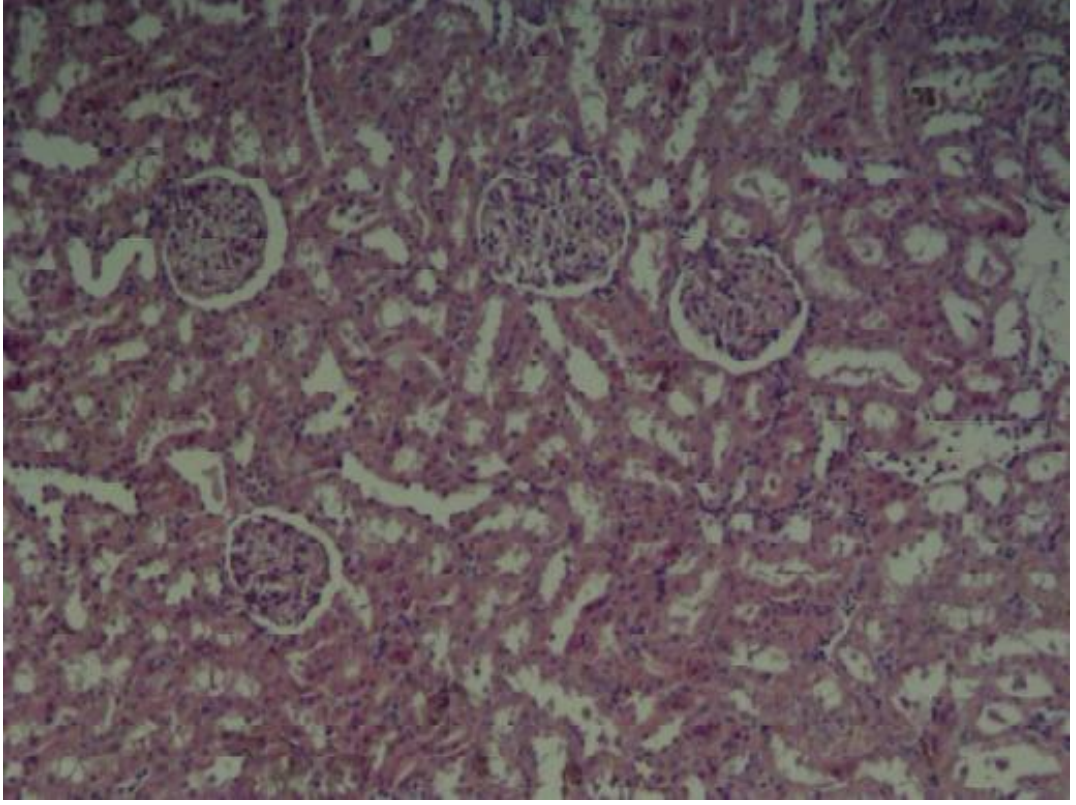
Resim 4. Metotrexat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Hepatositlerde piknotik çekirdek (beyaz ok), sinüzoidal dilatasyon (siyah ince ok) ve vasküler konjesyon (siyah kalın ok) düşük düzeyde gözlenmekte (H-E, x20).



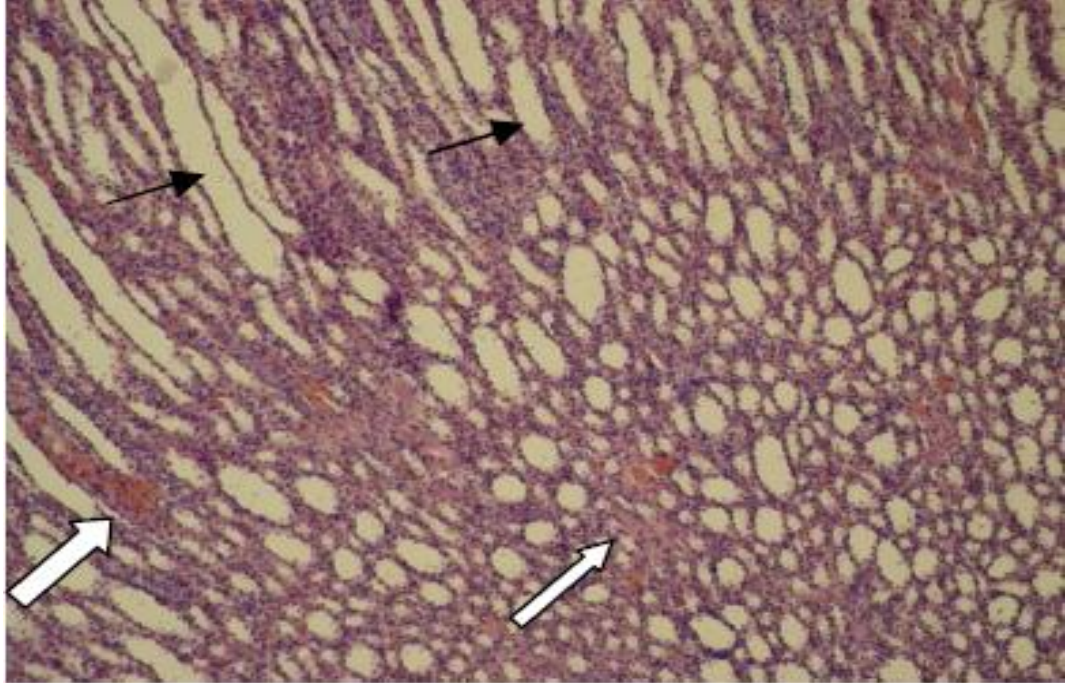
Resim 5. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Hepatositlerde piknotik çekirdek (siyah ok), sinüzoidal dilatasyon (beyaz ok) düşük düzeyde görülmekte (H-E, x10)



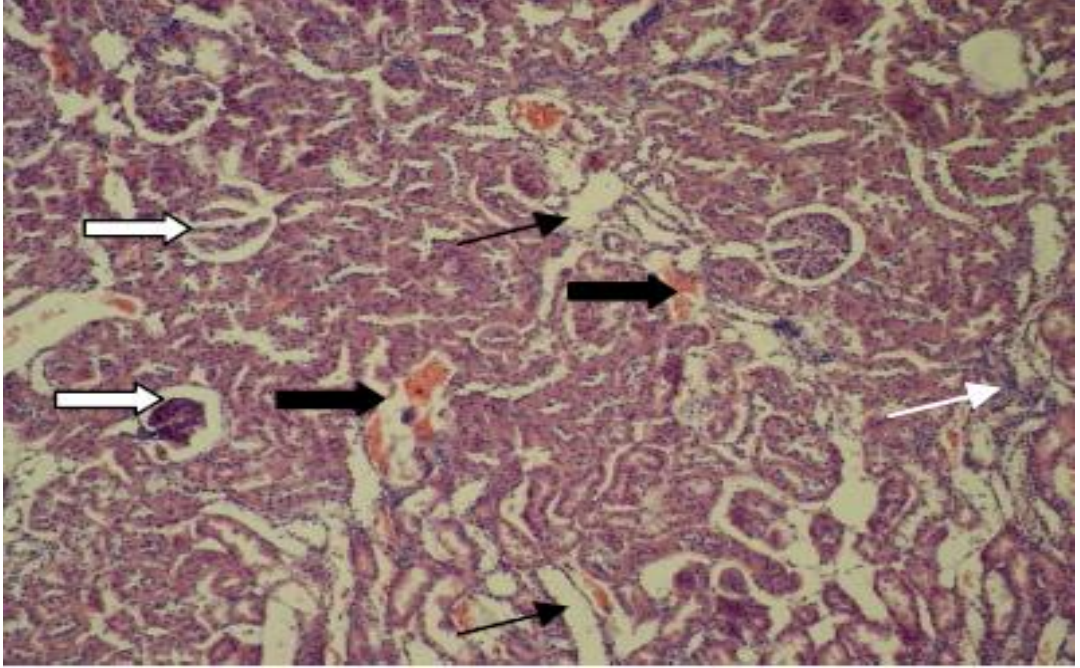
Resim 6. Metotreksat + Pentoksifilin + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Hepatositlerde piknotik çekirdek (siyah ince ok) ve vasküler konjesyon (siyah kalın ok) gözlenmekte (H-E, x10)



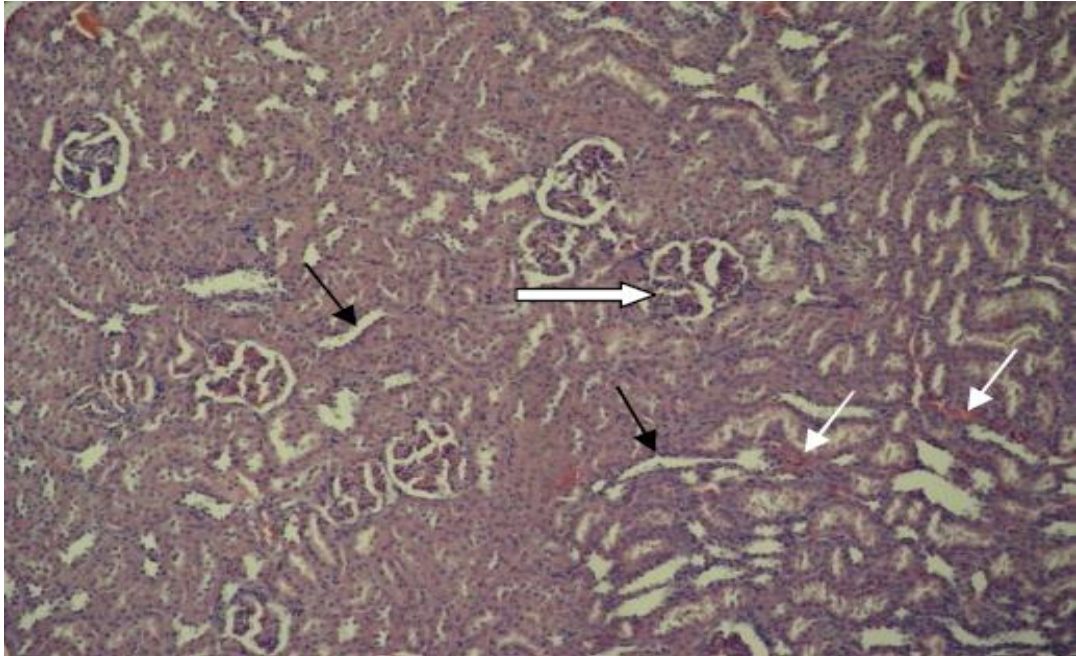
Resim 7. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Normal histolojik görünüm izlenmekte (H-E, x10).



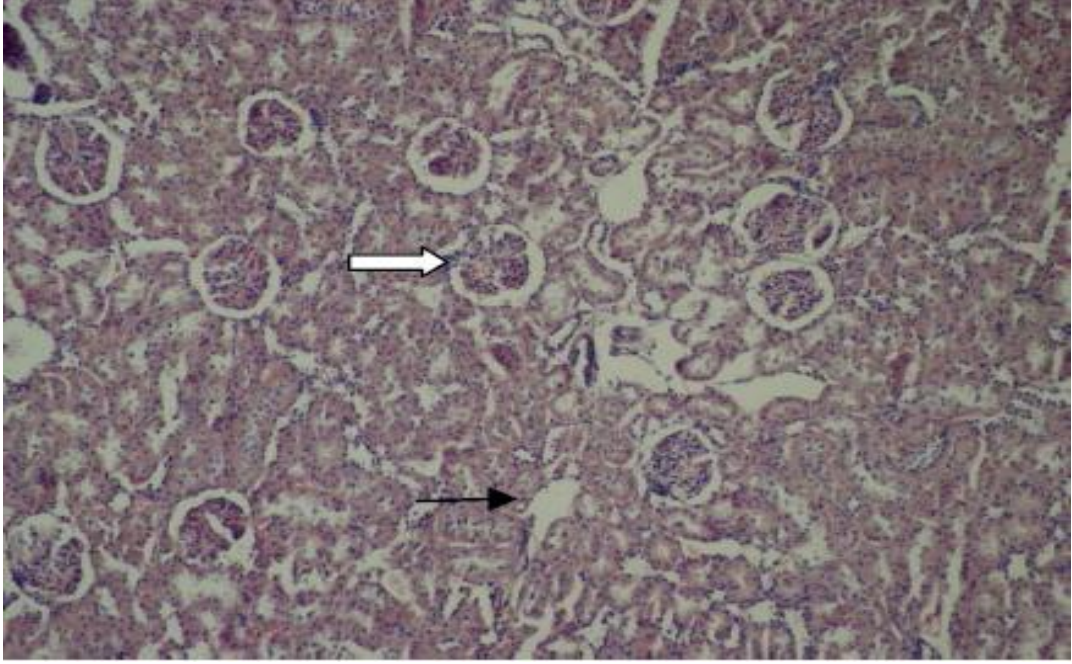
Resim 8. Metotrexat grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Metotrexat grubuna ait sıçan böbrek dokusu medulla bölgesinde vasküler konjesyon (beyaz ok), tübüler dilatasyon (siyah ok) belirgin olarak gözlenmekte (H-E, x10)



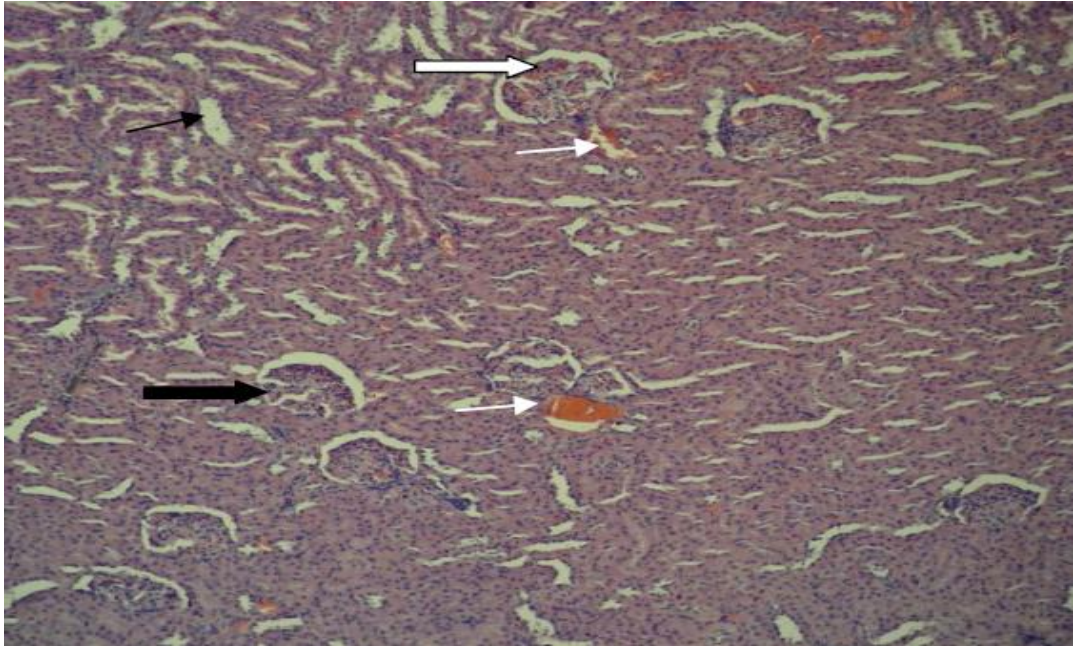
Resim 9. Metotrexat grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Glomerüler dejenerasyon (beyaz kalın ok), korteks bölgesinde vasküler konjesyon (siyah kalın ok), tübüler dilatasyon (siyah ince ok), tübüllerde hidropik dejenerasyon (siyah ince ok), inflamatuvar hücre infiltrasyonları (beyaz ince ok) belirgin olarak gözlenmekte (H-E, x10).



Resim 10. Metotrexat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Glomerüler dejenerasyon (beyaz kalın ok), vasküler konjesyon (beyaz ince ok), tübüler dilatasyon (siyah ince ok), düşük düzeyde gözlenmekte (H-E, x10)



Resim 11. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Glomerüller dejenerasyon (beyaz ok), tübüler dilatasyon (siyah ok) çok düşük düzeyde gözlenmekte (H-E, x10).



Resim 12. Metotreksat + Pentoksifilin+ Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Glomerüller dejenerasyon (siyah kalın ok), glomerüller konjesyon (beyaz kalın ok), vasküler konjesyon (beyaz ince ok), tübüler dilatasyon (siyah ince ok), düşük düzeyde gözlenmekte (H-E, x10).

4.5. Doku Örneklerinde İmmünohistokimyasal Bulgular

4.5.1. Karaciğer Doku Örneklerinde İmmünohistokimyasal Bulgular

4.5.1.1. Karaciğer Doku Örneklerinde iNOS İmmünboyanma

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan karaciğer doku kesitlerindeki iNOS yoğunluklarının belirlenmesinde, yarı nitel değerlendirme yöntemi kullanıldı (Tablo 9) (81).

İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde, Kontrol grubuna ait sıçanların karaciğer dokularında santral ven çevresinde iNOS'un çok düşük düzeyde boyandığı ya da hiç boyanmadığı gözlemlendi (Resim 13, Tablo 9).

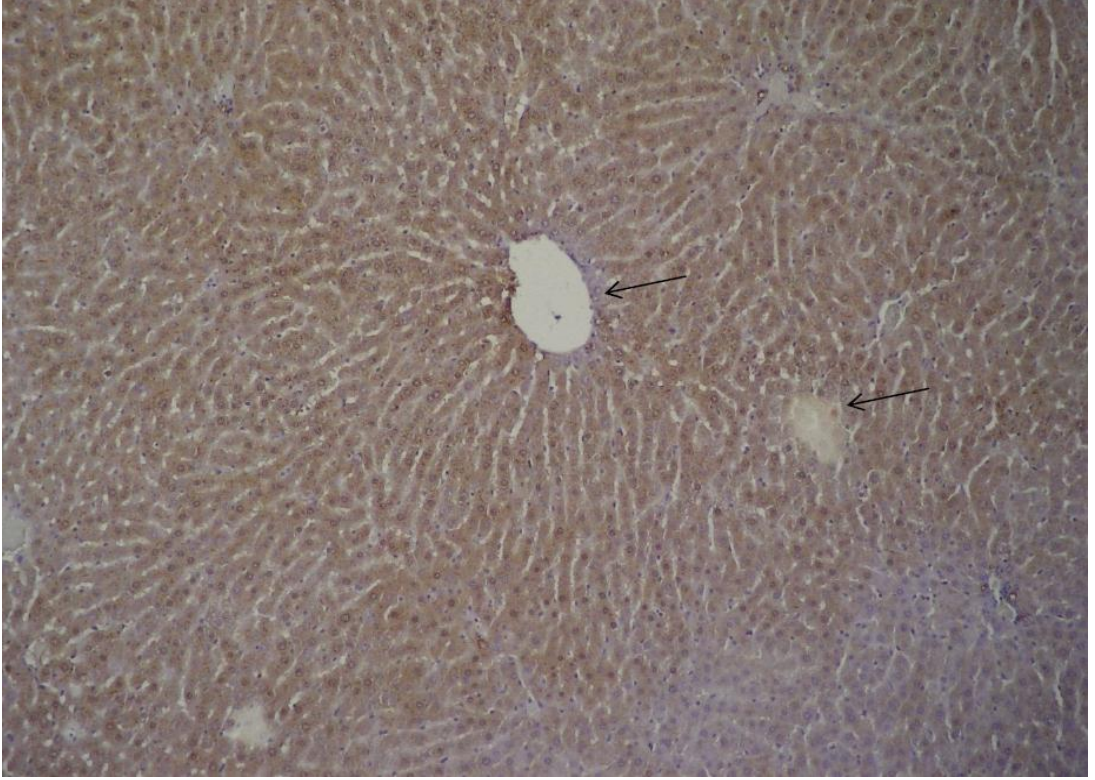
MTX grubuna ait sıçanların karaciğer dokularında parankimal alanlarda iNOS boyanmasının daha yoğun olduğu ve özellikle santral ven çevresinde çok yoğun boyandıkları gözlemlendi (Resim 14, Tablo 9).

MTX+ALA grubunda yer alan sıçanların karaciğer doku örneklerinde ise parankimde ve santral ven çevresinde iNOS boyanmasının düşük düzeyde olduğu gözlemlendi (Resim 16, Tablo 9).

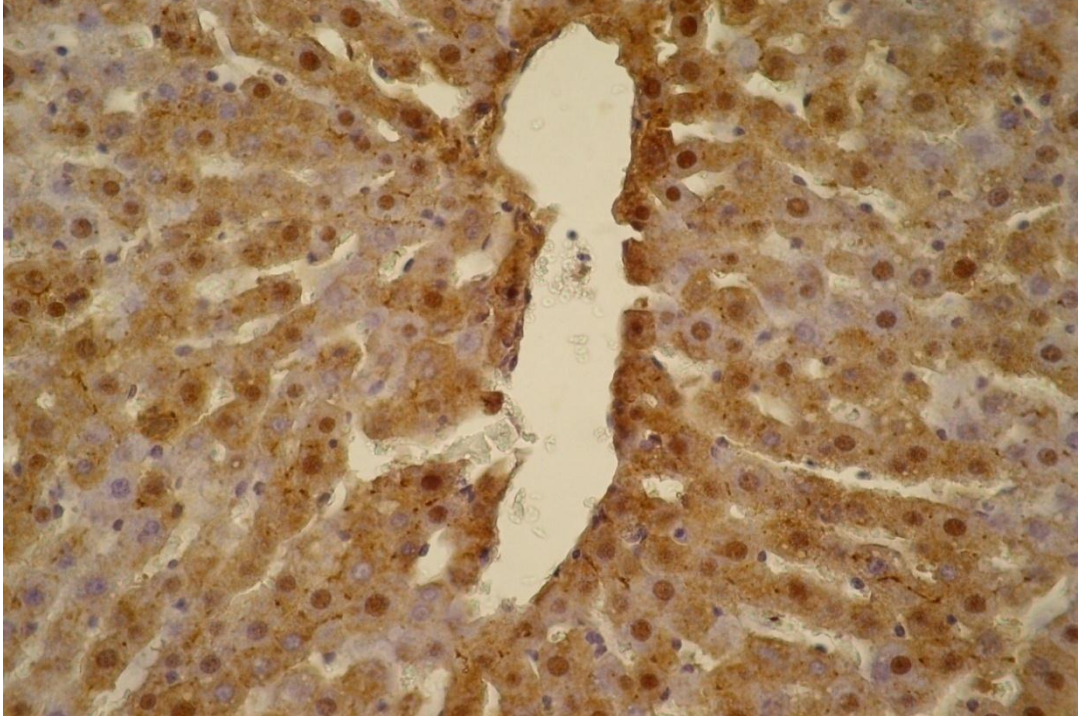
MTX+PTX grubunda (Resim 15, Tablo 9) ve MTX+PTX+ALA grubunda (Resim 17, Tablo 9) yer alan sıçanların boyanma derecesi MTX grubuna göre daha zayıf boyanmışken, kontrol grubuna göre orta düzey boyanma gözlemlendi.

Tablo 9. Karaciğer dokusunda gruplara göre ortalama iNOS immünboyanma dereceleri

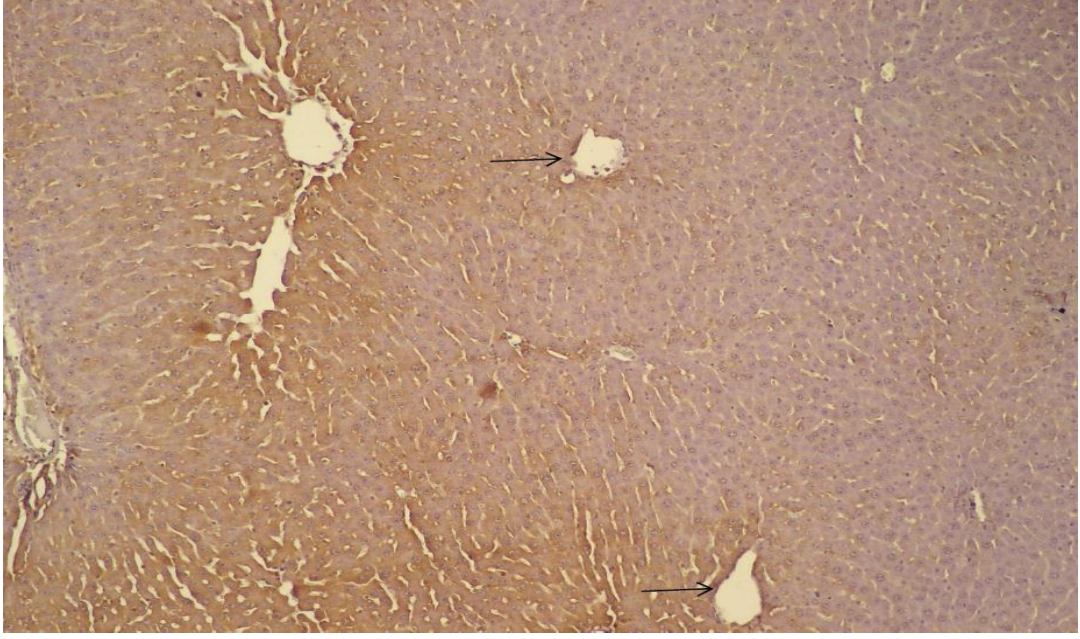
	Kontrol	MTX	MTX +PTX	MTX + ALA	MTX + PTX + ALA
Boyanma Derecesi	-/+	+++	++	+	++



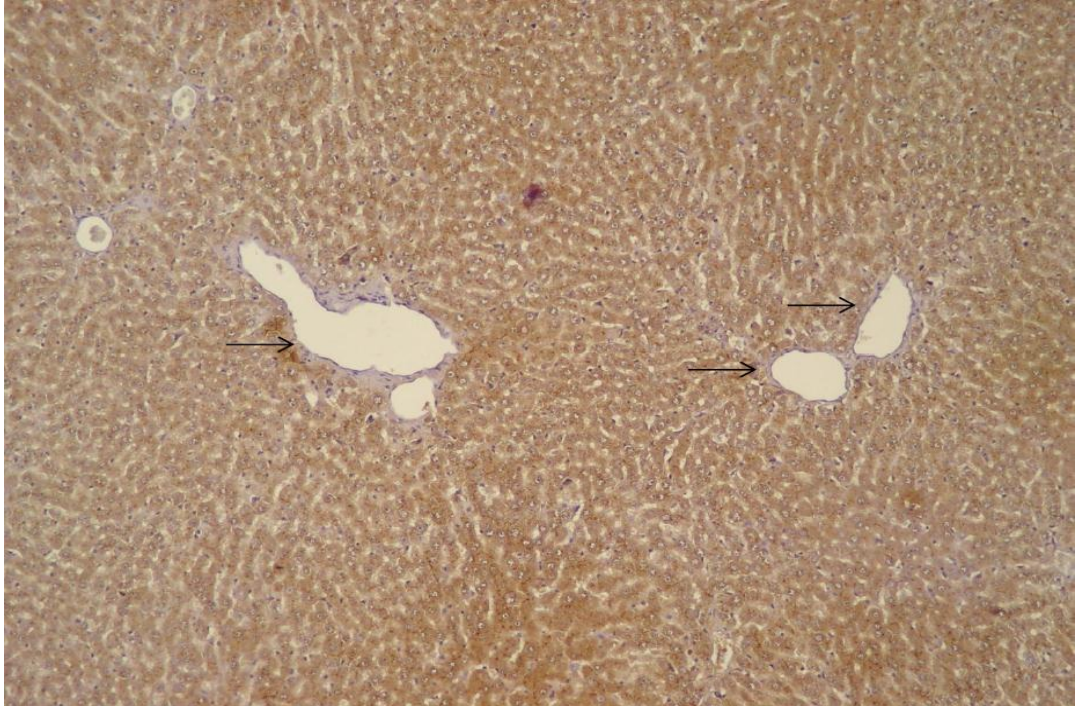
Resim 13. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Santal ven çevresinde (siyah ok) boyanma gözlenmemekte (iNOS immün boyama, x10).



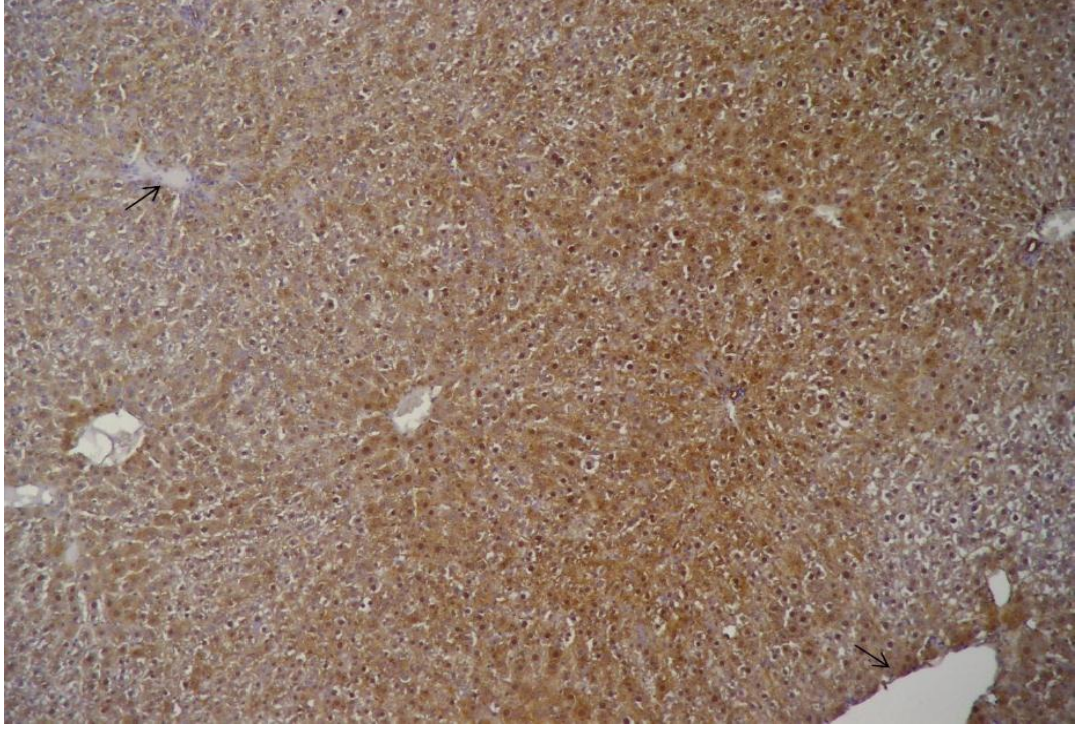
Resim 14. Metotrexat grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Santral ven çevresi alanlarda ve parankimde yoğun boyanma gözlenmekte (iNOS immün boyama, x40).



Resim 15. Metotreksat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Damar çevrelerinde (siyah ok) orta düzeyde boyanma gözlenmekte (iNOS immün boyama, x10).



Resim 16. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Damar çevrelerinde (siyah ok) zayıf düzeyde boyanma gözlenmekte (iNOS immün boyama, x10).



Resim 17. Metotreksat + Pentoksifilin + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Damar çevrelerinde (siyah ok) orta düzeyde boyanma gözlenmekte (iNOS immün boyama, x10).

4.5.1.2. Karaciğer Doku Örneklerinde TNF- α İmmünboyanma

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan karaciğer doku kesitlerindeki TNF- α yoğunluğunun belirlenmesinde, yarı nitel değerlendirme yöntemi kullanıldı (Tablo 10) (81).

İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde, Kontrol grubuna ait sıçanların karaciğer dokularında parankimde TNF- α boyanmasının çok düşük düzeyde boyandığı ya da hiç boyanmadığı gözlemlendi (Resim 18, Tablo 10).

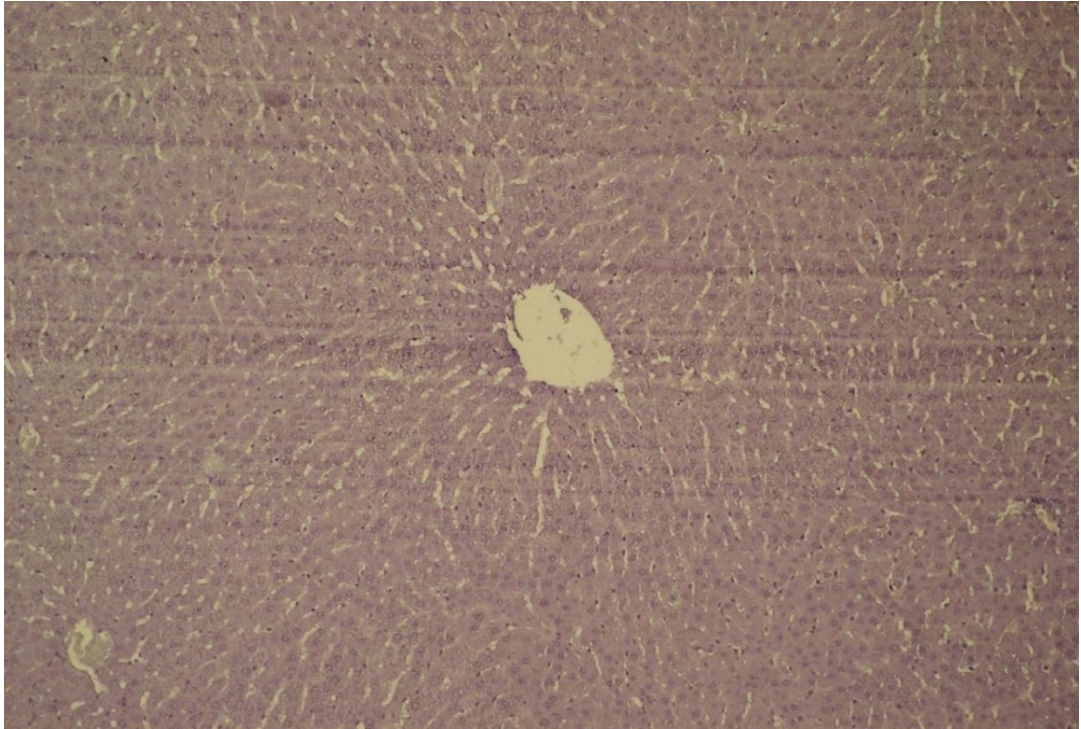
MTX grubuna ait sıçanların karaciğer dokularında parankimal alanlarda TNF- α boyanmasının çok yoğun olduğu gözlemlendi (Resim 19, Tablo 10).

MTX+ALA grubunda gruplarında yer alan sıçanların karaciğer doku örneklerinde ise parankimde TNF- α boyanmasının düşük düzeyde olduğu gözlemlendi (Resim 21, Tablo 10).

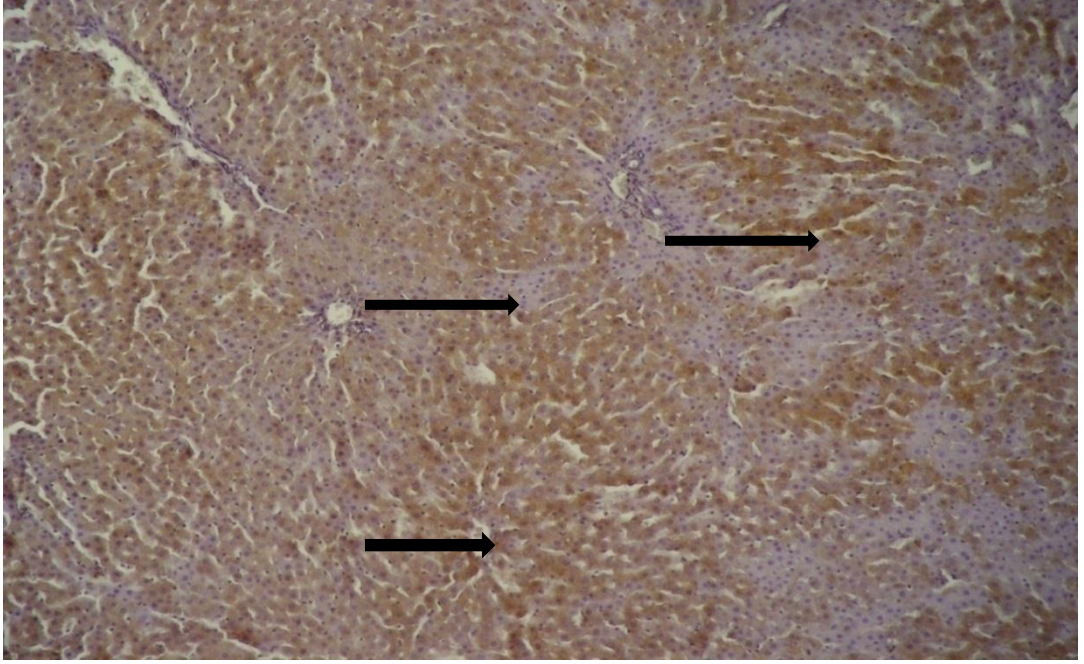
MTX+PTX grubunda (Resim 20, Tablo 10) ve MTX+PTX+ALA grubunda (Resim 22, Tablo 10) yer alan sıçanların karaciğer dokularında parankimal alanlarda TNF- α boyanması orta düzeyde gözlemlendi.

Tablo 10. Karaciğer dokusunda gruplara göre ortalama TNF- α immünboyanma dereceleri

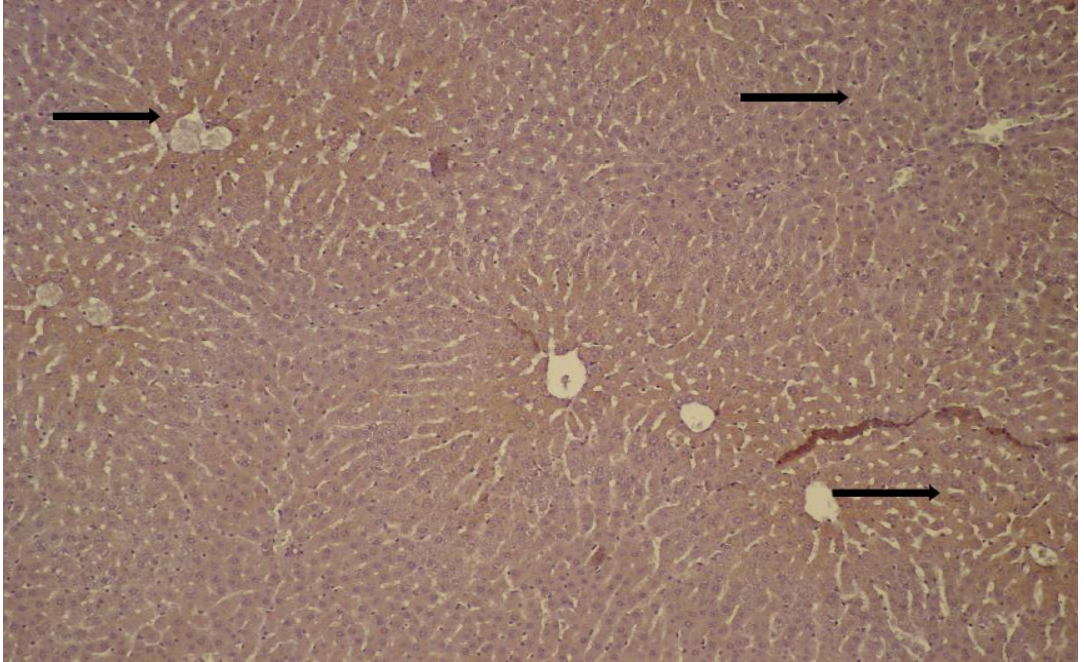
	Kontrol	MTX	MTX +PTX	MTX + ALA	MTX + PTX + ALA
Boyanma Derecesi	-/+	+++	++	+	++



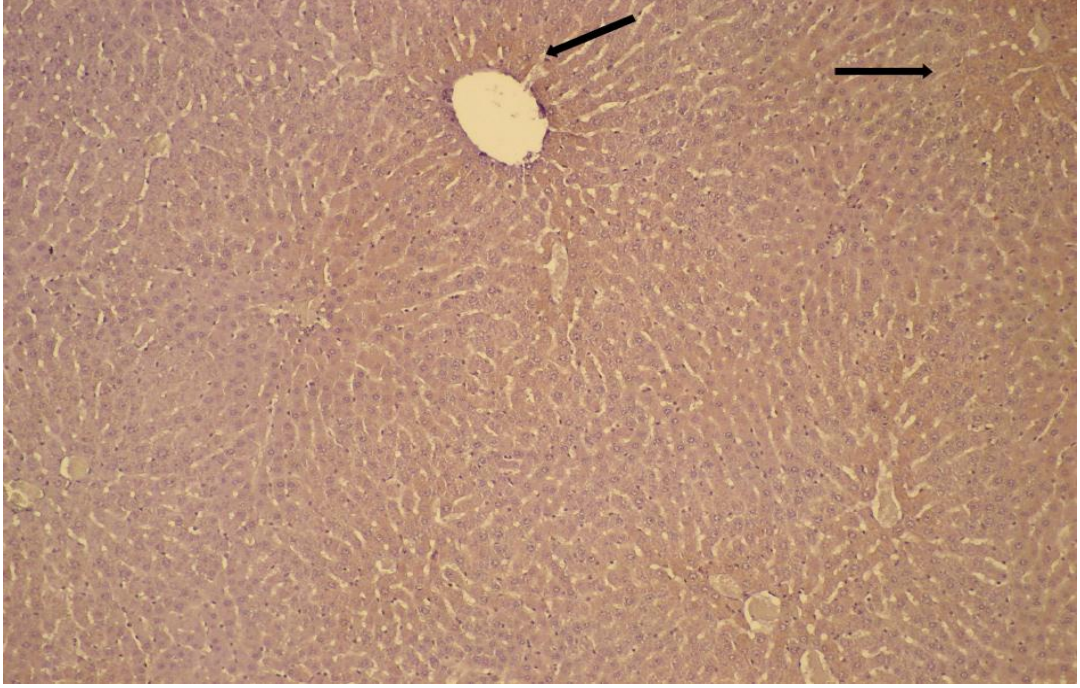
Resim 18. Kontrol grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Hepatosit sitoplazmasında boyanma gözlenmemekte (TNF- α immün boyama, x10).



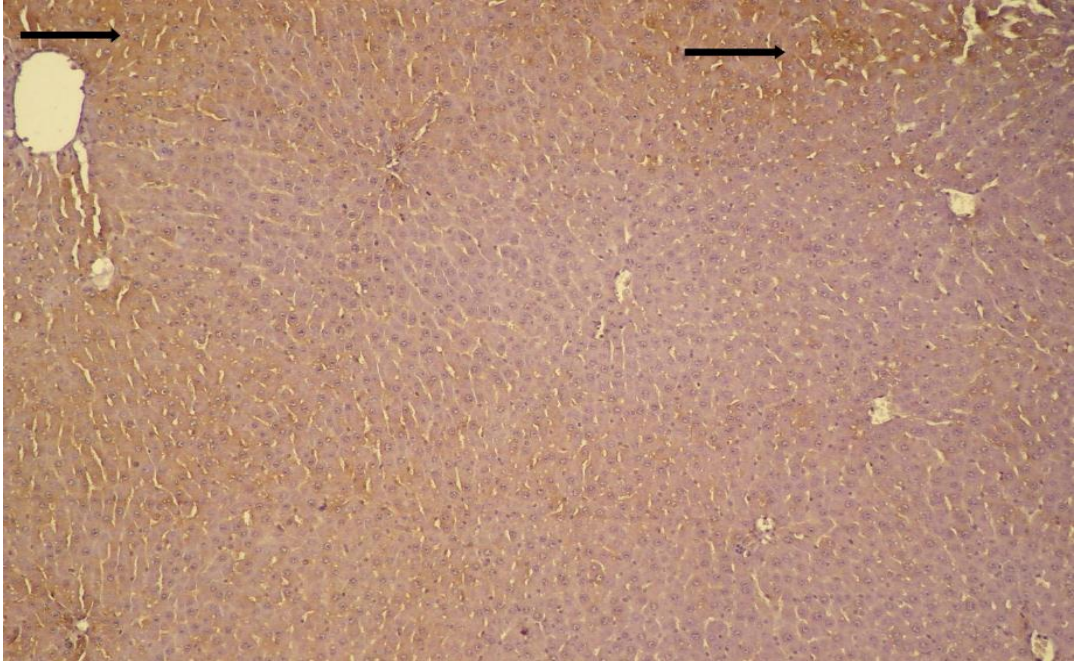
Resim 19. Metotreksat grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Parankimde hepatosit sitoplazmasında (siyah ok) yoğun boyanma gözlenmekte (TNF- α immün boyama, x10).



Resim 20. Metotreksat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Hepatosit sitoplazmasında (siyah ok) orta düzeyde boyanma gözlenmekte (TNF- α immün boyama, x10).



Resim 21. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Hepatosit sitoplazmasında (siyah ok) düşük düzeyde boyanma gözlenmekte (TNF- α immün boyama, x10).



Resim 22. Metotreksat + Pentoksifilin + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan karaciğer dokusu. Hepatosit sitoplazmasında (siyah ok) orta düzeyde boyanma gözlenmekte (TNF- α immün boyama, x10).

4.5.2. Böbrek Doku Örneklerinde İmmünohistokimyasal Bulgular

4.5.2.1. Böbrek Doku Örneklerinde iNOS İmmünboyanma

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan böbrek doku kesitlerindeki İnos yoğunluğunun belirlenmesinde, yarı nitel değerlendirme yöntemi kullanıldı (Tablo 11) (81).

İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde, Kontrol grubuna ait sıçanların böbrek dokularında iNOS'un çok düşük düzeyde boyandığı ya da hiç boyanmadığı gözlemlendi (Resim 23, Tablo 11).

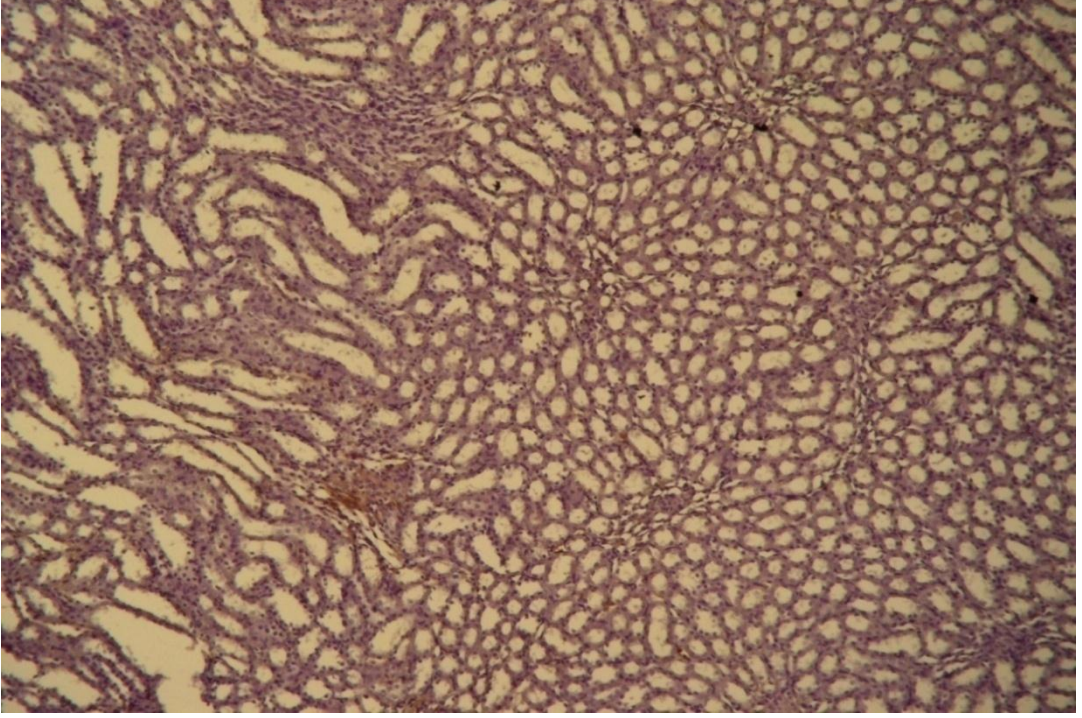
MTX grubuna ait sıçanların böbrek dokularında özellikle meduller bölgede damar çevrelerinde göze batan çok yoğun boyanma gözlemlendi (Resim 24, Tablo 11).

MTX+ALA grubunda yer alan sıçanların böbrek doku örneklerinde ise iNOS boyanmasının düşük düzeyde olduğu gözlemlendi (Resim 26, Tablo 11).

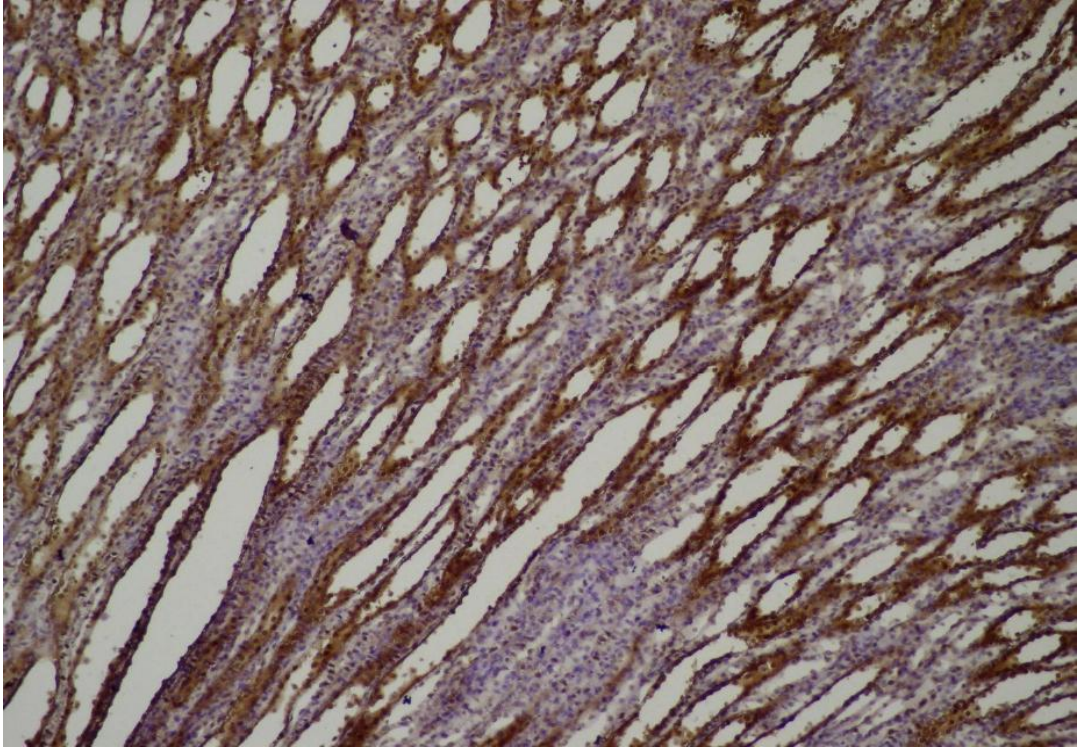
MTX+PTX grubunda (Resim 25, Tablo 11) ve MTX+PTX+ALA grubunda (Resim 27, Tablo 11) yer alan sıçanların böbrek dokularında iNOS boyanması orta düzeyde gözlemlendi.

Tablo 11. Böbrek dokusunda gruplara göre ortalama iNOS immünboyanma dereceleri

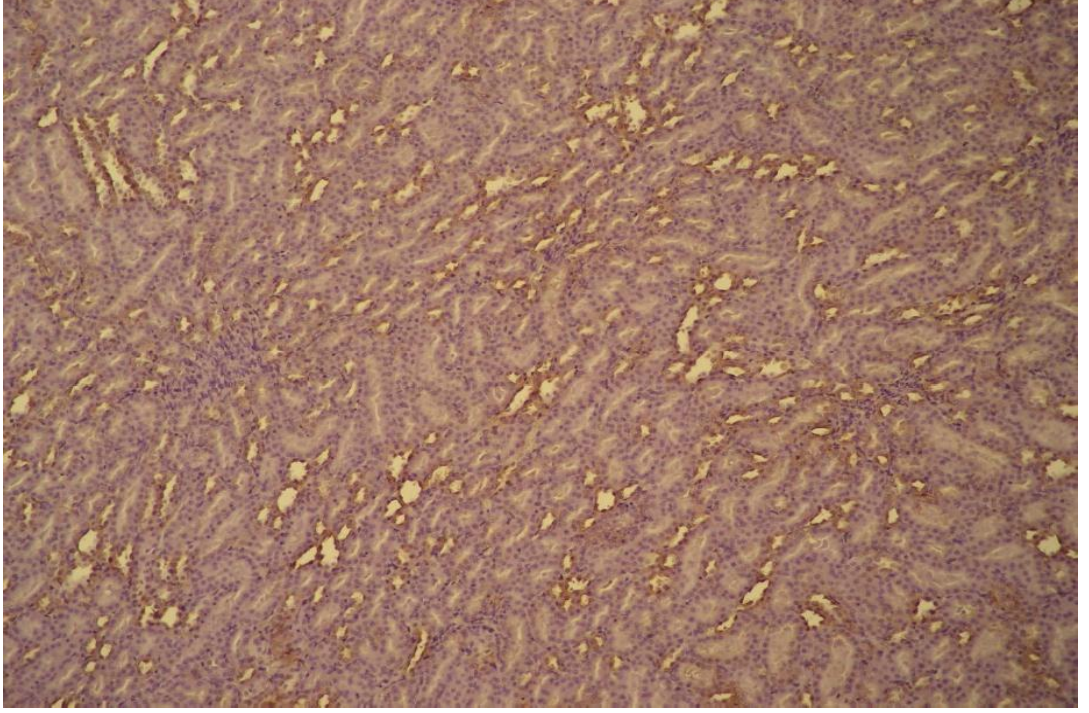
	Kontrol	MTX	MTX +PTX	MTX + ALA	MTX + PTX + ALA
Boyanma Derecesi	-/+	+++	++	+	++



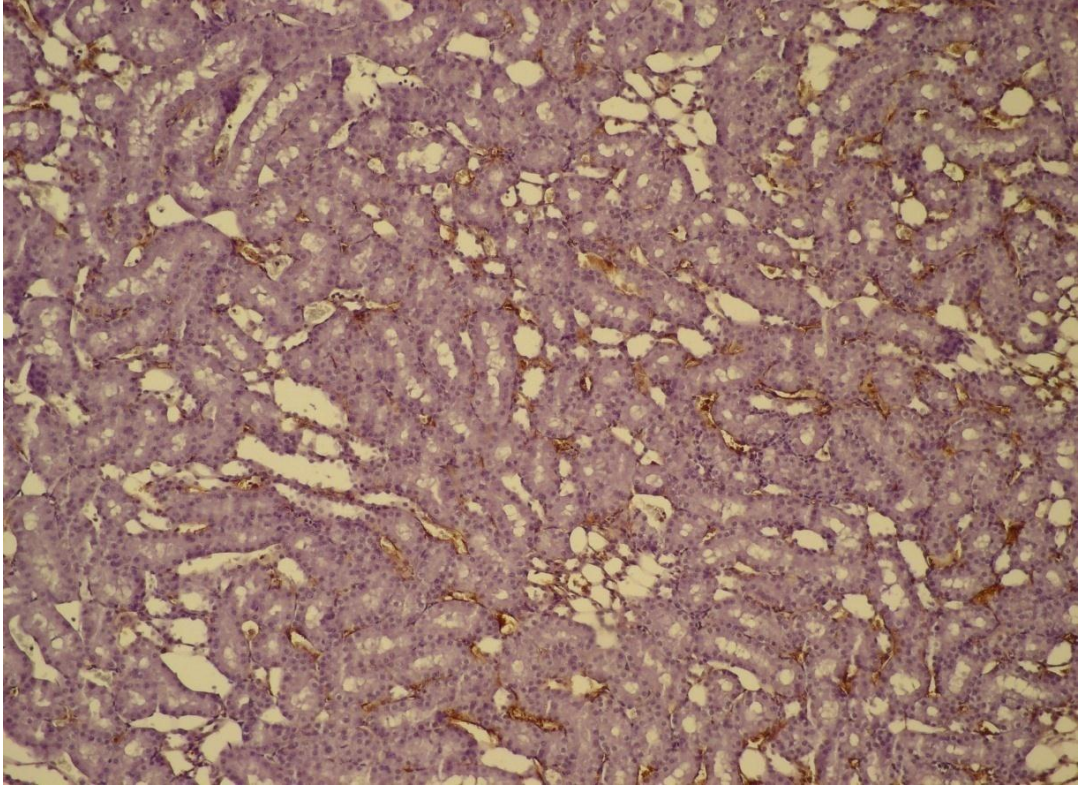
Resim 23. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Damar çevrelerinde çok zayıf boyanma gözlenmekte (iNOS immün boyama, x10).



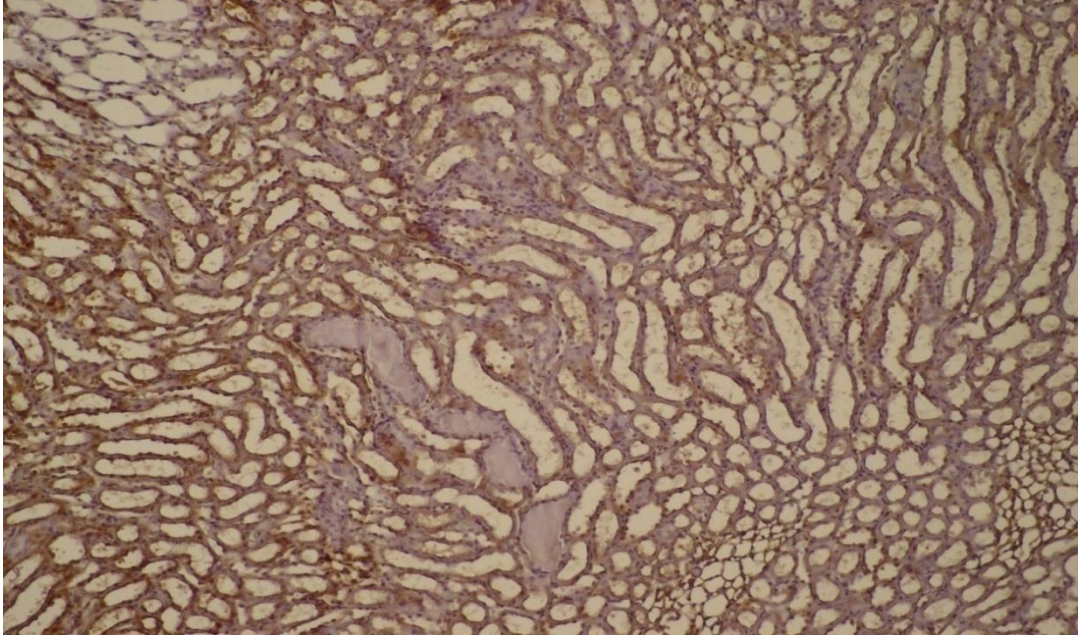
Resim 24. Metotreksat grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Meduller bölgede damarsal alanlarda yoğun boyanma gözlenmekte (iNOS immün boyama, x10).



Resim 25. Metotreksat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Damar çevrelerinde orta düzeyde boyanma gözlenmekte (iNOS immün boyama, x10).



Resim 26. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Damar çevrelerinde düşük düzeyde boyanma gözlenmekte (iNOS immün boyama, x10).



Resim 27. Metotreksat + Pentoksifilin + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Damar çevrelerinde orta düzeyde boyanma gözlenmekte (iNOS immün boyama, x10).

4.5.2.2. Böbrek Doku Örneklerinde TNF- α İmmünboyanma

İmmünohistokimyasal yöntemle boyanan böbrek doku kesitlerindeki TNF- α yoğunluğunun belirlenmesinde, yarı nitel değerlendirme yöntemi kullanıldı (Tablo 12) (81).

İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde, Kontrol grubuna ait sıçanların böbrek dokularında TNF- α boyanmasının çok düşük düzeyde olduğu ya da olmadığı gözlemlendi (Resim 28, Tablo 12).

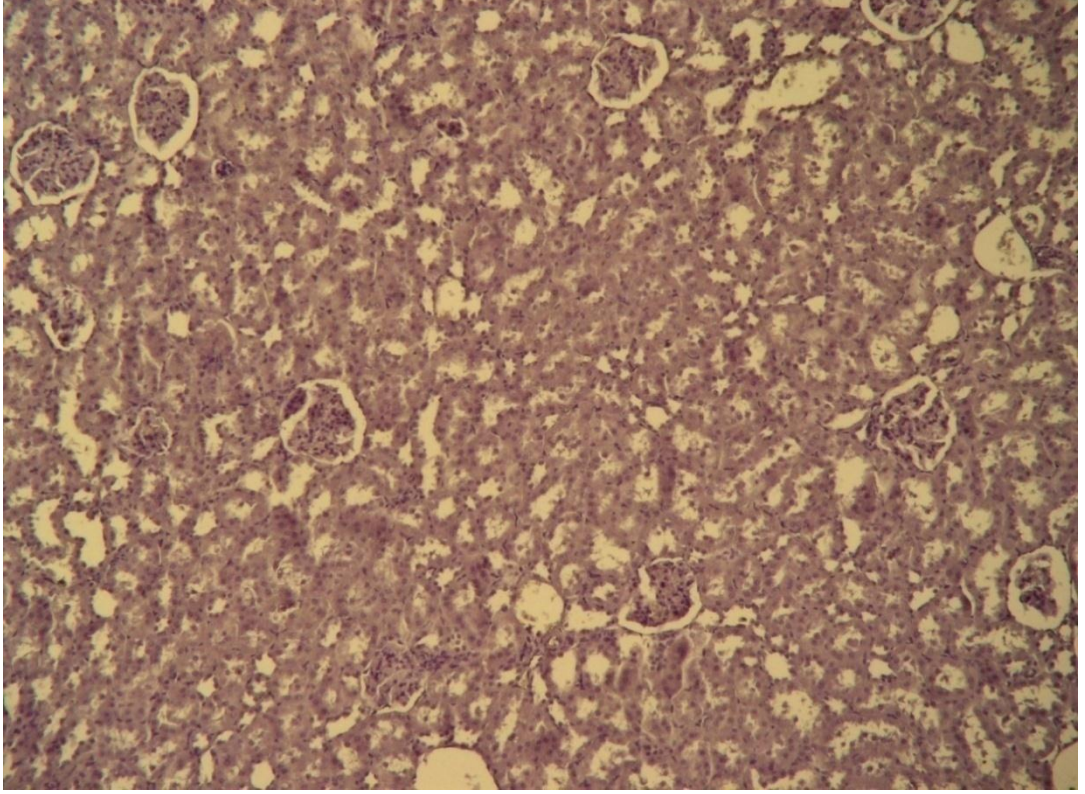
MTX grubuna ait sıçanların böbrek dokularında özellikle kortikal bölgede dikkat çeken çok yoğun boyanma gözlemlendi (Resim 29, Tablo 12).

MTX+ALA grubunda yer alan sıçanların böbrek doku örneklerinde ise TNF- α boyanmasının düşük düzeyde olduğu gözlemlendi (Resim 31, Tablo 12).

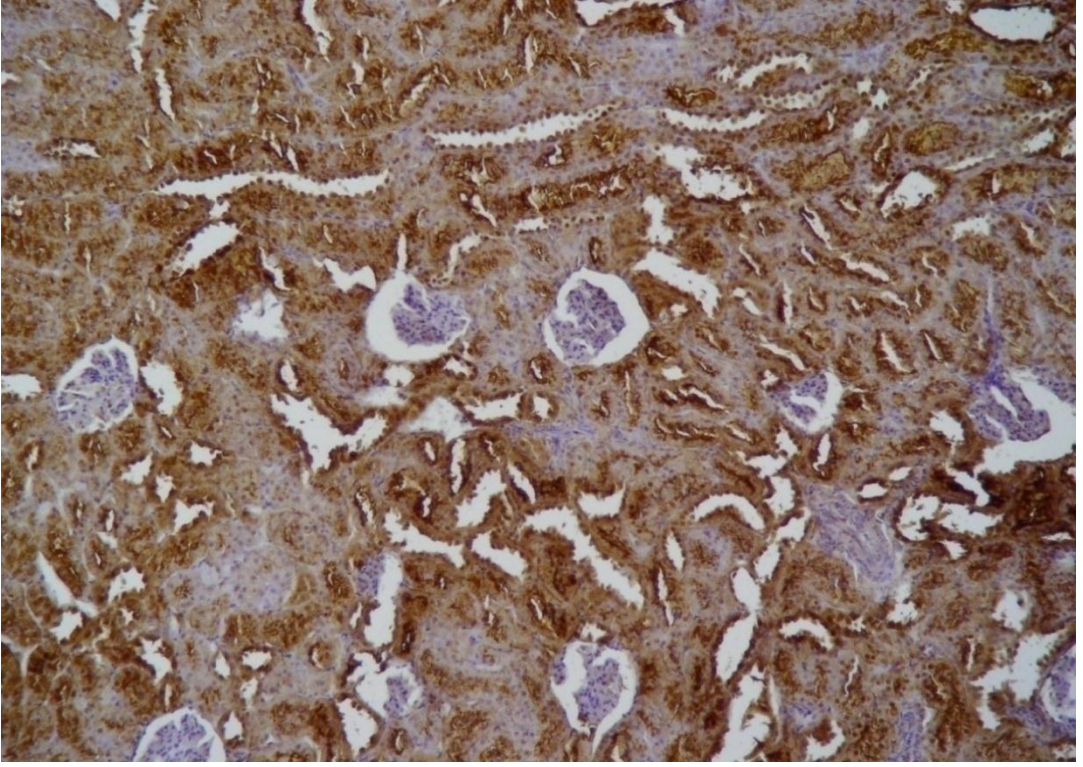
MTX+PTX grubu (Resim 30, Tablo 12) ve MTX+PTX+ALA grubunda (Resim 32, Tablo 12) yer alan sıçanların böbrek dokularında TNF- α boyanması orta düzeyde gözlemlendi.

Tablo 12. Böbrek dokusunda gruplara göre ortalama TNF- α immünboyanma dereceleri

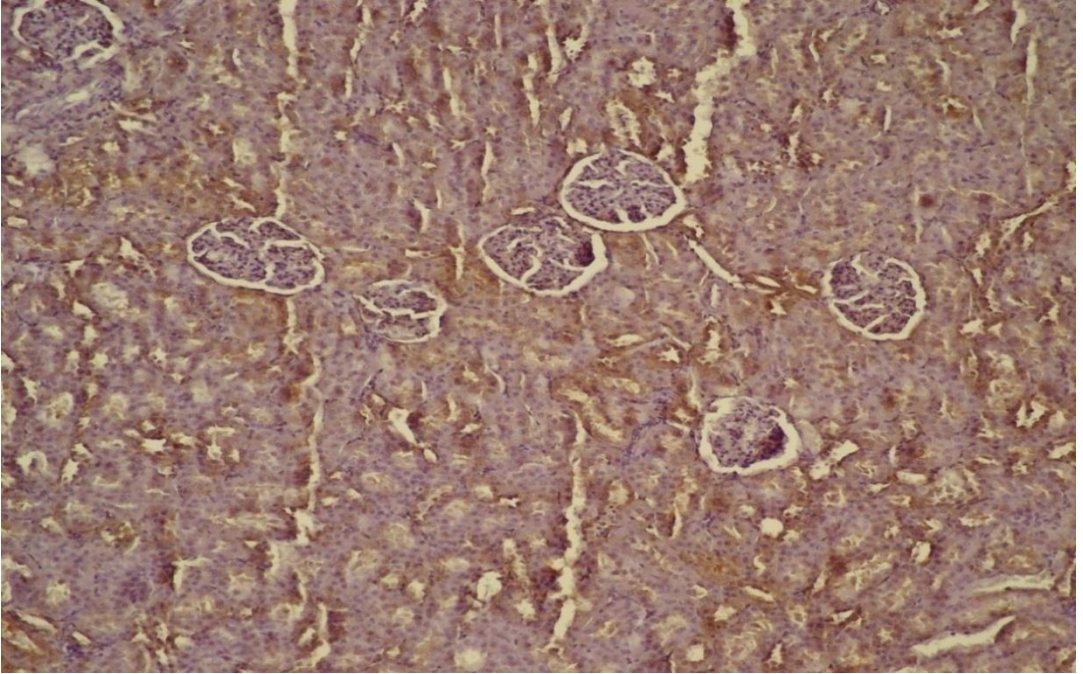
	Kontrol	MTX	MTX +PTX	MTX + ALA	MTX + PTX + ALA
Boyanma Derecesi	-/+	+++	++	+	++



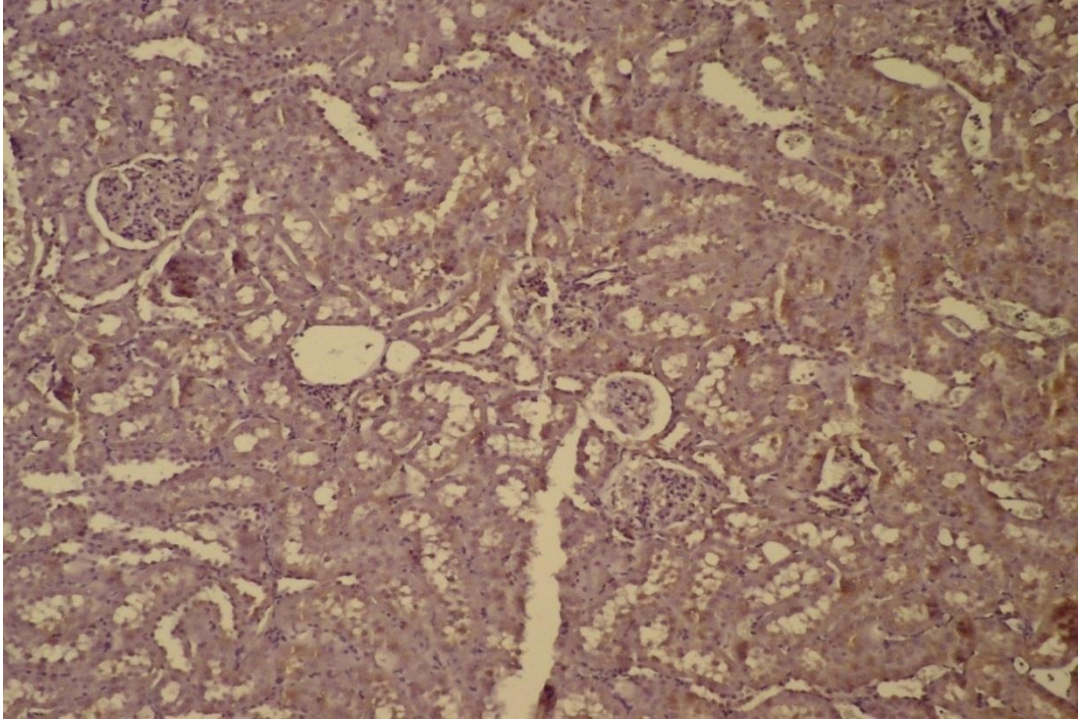
Resim 28. Kontrol grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Parankimde boyanma gözlenmemekte (TNF- α immün boyama, x10).



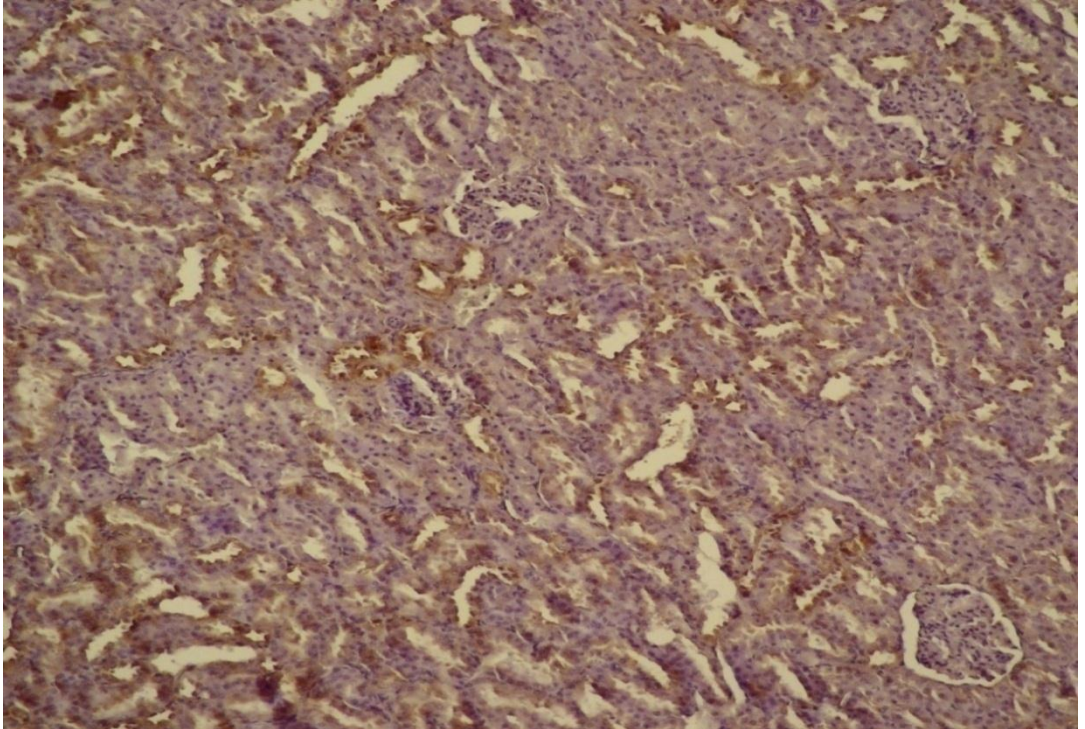
Resim 29. Metotreksat grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Parankimde çok yoğun boyanma gözlenmekte (TNF- α immün boyama, x10).



Resim 30. Metotreksat + Pentoksifilin grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Parankimde orta düzeyde boyanma gözlenmekte (TNF- α immün boyama, x10).



Resim 31. Metotreksat + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Parankimde düşük düzeyde boyanma gözlenmekte (TNF- α immün boyama, x10).



Resim 32. Metotreksat + Pentoksifilin + Alfa Lipoik Asit grubuna ait sıçan böbrek dokusu. Parankimde orta düzeyde boyanma gözlemekte (TNF- α immün boyama, x10).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bir folat antimetaboliti olan MTX; yüksek dozlarda birçok malignitede (osteosarkom, baş ve boyun tümörleri vb.), düşük dozlarda ise otoimmün hastalıklarda (RA, JRA vb.) terapotik ajan olarak kullanılan sitotoksik bir ilaçtır. MTX, bu geniş kullanım endikasyonlarına karşın, özellikle pnömoni, nefrotoksisite ve hepatotoksisite gibi bir dizi yan etkilerle (2-4) birlikte kemik iliği supresyonu, mukozit, pulmoner fibrozis gibi reaksiyonlar nedeniyle, zaman zaman ilaç kullanımında kısıtlamalara gidilmiştir. Yapılan son çalışmalar MTX aracılı toksisite gelişiminin serbest oksijen radikalleri ve hidrojen peroksit ile ilişkili olduğu gösterilmiştir Hepatotoksisite ve nefrotoksisite başta olmak üzere, gelişen bu yan etkilerden genellikle reaktif oksijen radikallerinin (ROS) meydana getirdiği oksidatif hasar sorumlu tutulmuştur (4-6). Buna yönelik olarak da, dokuları MTX harabiyetinden korumak için antioksidan ajanlar denenmiş ve önemli ölçüde başarılı olunmuştur (4, 46, 131). Biz de bu hasarı önlemek amaçlı antioksidan özelliği kanıtlanmış olan PTX ve ALA'yı kullandık (20, 23-25).

PTX, Tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) sentezini (14, 15) ve TNF- α 'nın indüklediği makrofajik NO sentezini (14, 16-19) bloke eder. Ayrıca $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O_2 peroksit iyonlarının fazladan salınımını önler ve bu da PTX'in antioksidan aktivitesinin olduğunu gösterir (20).

ALA'nın hücre içi ROS'ların pek çoğunun radikalik etkisini süpürerek oksidatif stresle savaştığı pek çok çalışma ile gösterilmiş (23-25) ve ROS'ların radikal etkilerinin süpürülerek ortadan kaldırılması bir tarafa vitamin C, vitamin E, ve GSH gibi diğer hücrel antioksidanların rejenere edilerek yeniden kullanılabilir forma getirilmesini de LA'nın sağladığı belirlenmiştir (25-28).

Ratlarda MTX kullanımıyla, Kc dokularında MDA ve MPO düzeyleri artarken, histokimyasal olarak da patolojik bulgular görülmekte iken thiamin pirofosfatla bu bulgular iyileştirilmiştir (132). Benzer şekilde yapılan bir çalışmada, ratlarda MTX (20 mg/ kg ip tek doz) kullanımı ile Kc dokusunda düzeyi artan MDA ve MPO, Montelukast eklenmesi ile normal düzeylere çekilmiştir. MTX kullanımı ile mikroskobik hasar skorlanması anlamlı derecede artarken montelukast ile geriletilmiştir (133). Ratlarda MTX (20 mg/ kg ip tek doz) kullanımı ile serumda

TNF- α düzeyinde artma, Kc dokusunda MDA ve MPO düzeylerinde artma, mikroskopik düzeyde patolojik bulgular görülürken Resveratrol verilerek Kc dokusunda biyokimyasal ve histopatolojik düzelme sağlanmış (134). Kurkimin ve üzüm çekirdeği ekstresi gibi ajanlarla da, Kc dokusunda MTX'e bağlı gelişen oksidatif hasarın biyokimyasal olarak düzeltilebildiği gösterilmiştir (135, 136). Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, MTX ile oluşturulan Kc hasarında kullanılan β -karoten, radikal süpürücü etkisiyle histolojik ve biyokimyasal iyileşme sağlamıştır (137). Ratlarda MTX (20 mg/ kg ip tek doz) kullanımı ile böbrek dokusunda MDA düzeylerinde artma, SOD, GSH-Px düzeylerinde azalma, serum BUN, Cr ve TNF- α düzeylerinde artma ve mikroskopik düzeyde renal doku hasar indexinde artma saptanmış ve PTX (50 mg/kg ip 6 gün boyunca) eklenmesi sonucu bahsedilen bulgularda düzelme sağlanmış (12). Ratlarda MTX (20 mg/ kg ip tek doz) kullanımı ile böbrek dokusunda SOD, CAT, GSH-Px aktivitesindeki azalma, MDA düzeyindeki artma antioksidan Caffeic Acid Phenethyl Ester ile düzelmiş (46). Ratlarda MTX aracılı oksidatif renal hasar modelinde renal dokuda MDA ve MPO düzeyleri ile birlikte SOD ve CAT enzim aktivitelerinde de artış gözlenmiş ve N-Asetilsistein ile değerler düşürülmüştür (138). Siroz ve sağlıklı kişilerde iNOS seviyeleri immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiş sağlıklı bireylerde neredeyse yok olan iNOS ekspresyonunun sirozla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği tespit edilmiştir (139). Karaciğer iskemi reperfüzyonunda iNOS immünohistokimyasal olarak artışı gösterilmiştir (140). CCl₄ ile oluşturulan karaciğer hasarında iNOS seviyesinin arttığını bulmuşlardır. Ayrıca NO'nun azalması lipid peroksidasyonunu sınırlamaktadır (141). Lipopolisakkarite bağlı doku hasarında iNOS inhibisyonunun doku hasarını iyileştirebileceği öne sürülmüştür (142). Siroz gelişirken özellikle erken evrelerde hepatositlerde ve inflamatuvar hücrelerde iNOS eksprese olduğunu göstermişlerdir (130). Bazı araştırmacılar, iNOS'un sağlıklı bireylerde de salındığını ancak sirozlu bireylerde arttığını söylemektedir (143, 144). Yüksek miktarda salınan NO'nun karaciğerde fazla üretiminin hepatotoksisite ile bağlantılı olabileceğini söylemektedir (145). Akut endotokseminde PTX uygulamasında akut karaciğer hasarlanması iNOS azalmasıyla tespit edilmiştir (108, 143). Kronik etanolle oluşturulan karaciğer hasarlanmasında iNOS aktivitesi artmaktadır, bu da hasar belirteci olarak vurgulanmaktadır (144).

Eser miktarda salınan NO karaciğerde normalde de salınır ancak yüksek miktarda hasarı artırır (146, 147).

Ratlarda ilaç aracılı nefrotoksisite modelinde artan MDA değerlerini ve şiddetli histopatolojik değişiklikleri PTX tedavisiyle geriye döndürmeyi başarmışlar (148, 149). İlaç aracılı hepatotoksisite oluşturulan rat modelinde tedavi amaçlı verilen PTX, MDA seviyelerinde düşme, serum NO ve ALP değerlerinde azalma ve histopatolojik olarak düzelme sağlamıştır (150).

İlaç aracılı nefrotoksisite oluşturulan rat modelinde tedavi amaçlı verilen ALA; SOD, CAT, GSH-Px enzim aktivitelerini arttırmayı, MDA, NO ve serum Cr ve üre düzeylerini de azaltmayı ve histopatolojik olarak da düzeltmeyi başarmıştır (151). Ratlarda ilaç aracılı oksidatif stres oluşturulan modellerinde ALA ile yapılan tedavide azalan böbrek antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD, CAT, GSH-Px) artma, artan serum ALP düzeylerinde azalma sağlanmıştır (152). İlaç aracılı nefrotoksisite oluşturulan rat modellerinde tedavide ALA (100 mg/kg) verilerek; artan serum üre, Cr değerlerini azaltmış, azalan SOD aktivitesini arttırmış, artan MDA düzeylerini ise azaltarak ve histolojik hasar indexinde azalma sağlayarak koruyucu etkisini göstermiştir (153). İlaç aracılı nefrotoksisite oluşturulan rat modellerinde artan dozlarda ALA tedavisi sonrası antioksidan savunma sistemine etkileri incelenmiş; daha düşük dozlara göre 100 mg/kg ip dozu antioksidan savunma sisteminde daha etkili bulunmuştur (154). Asetaminofenle oluşturulan mitokondriyal oksidatif strese karşı α - tokoferol ve ALA (100 mg/kg) karşılaştırılmış ve oksidatif strese karşı ALA daha koruyucu bulunmuş (155). MTX (20 mg/kg) aracılı oluşturulan mitokondriyal oksidatif stresle birlikte azalan GSH-Px aktivitesinin, ALA tedavisi ile arttığı görülmüş (156). Ratlarda ilaç aracılı pankreatit modellerinde, PTX ve ALA tekli tedavi ve PTX+ALA kombine tedavi verilerek etkileri incelenmiş, artan pankreatik MPO, serum MDA düzeyleri, histopatolojik skorda kombine 7 günlük tedavide daha etkin düzelme gözlenirken, tekli 7 günlük tedavi gruplarından da ALA daha etkin bulundu (157).

Deney sırasında rat ölümleri meydana gelmiş ve bu ölümlerin hepsi tedavi gruplarında gerçekleşmiştir. Ölüm sonrası yapılan otopsilerde özellikle kombine tedavi grubunda bulunan ratlarda mide hacimleri yaklaşık 3 katına çıkmış ve

bağırsak içeriği yok denecek kadar azdı. Bunun dışında belirgin bir patolojiye rastlanmadı. Hem PTX'in hem de ALA'nın gastrointestinal yan etkilerinin olduğunu düşünürsek ratlarda, ilaç yan etkisine bağlı gastrointestinal bulgular gelişmiş olabilir. Ölümün fazla olduğu gruplardaki ortak ilaç ise ALA'dır. Bu sonuçlar, çalışmada 100 mg/kg/gün dozunda kullandığımız bu ilacın dozunun fazla gelme ihtimalini düşündürüyor. Her ne kadar verdiğimiz dozda yapılan çalışmalar varsa da ratlarda farklı cinslerin ilaçlara vereceği reaksiyon farklı olabilir. Bu bağlamda, dozlar azaltılarak yeni bir deney protokolü, kombine etkiyi araştırmak amaçlı denenebilir. Diğer taraftan kombine grupta 8 ratın ölmesi ilaç etkileşimi olabileceği ihtimalini de düşündürüyor. Sonuç itibarıyla kombine tedavi grubunda iki ratın kalması sebebiyle, bu grubu biyokimyasal değerlendirmelere dahil etmedik.

Çalışmamızın kan biyokimya sonuçlarından serum BUN ve üre düzeylerinde kontrol grubuna göre; istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da MTX grubunda artma saptandı ve tedavi gruplarında da anlamlı olmayan azalma saptanırken; en fazla azalma MTX+ALA grubunda gözlemlendi. Ayrıca MTX grubuna göre; tedavi grubunda özellikle de MTX+ALA ($p=0,028$, $p=0,028$) grubunda anlamlı bir düşme sözkonusuydu. Bu bulgular bahsedilen çalışmalara benzer nitelikte idi. Çalışmamızda böbrek hasarı, MTX+ALA grubuyla daha etkin tedavi edilmiştir.

Analiz edilen serum enzim düzeylerinde kontrole göre; MTX eklenen tüm gruplarda bir azalma mevcut olduğu gözlemlendi. Bu azalmayı MTX'in moleküler düzeyde enzim üzerine direkt toksik etkisine bağlayabiliriz. TBil ($p=0,046$) ve DBil düzeylerinin de MTX grubunda azalması, hepatotoksisite sonucunda DBil oluşamamasına bağlı olabilir. MTX+ALA grubunda ise azalan TBil ($p=0,003$) ve DBil ($p=0,018$) değerleri artış göstermektedir. Demek ki bu anlamda ALA enzim hasarından korumuş görünüyor. Kastaki kreatin-fosfattan spontan olarak oluşan kreatinin düzeyleri MTX grubunda azalmıştı. Bu azalma anlamlı olmayıp kas hasarının bir göstergesi olabilir. Tedavi verilen gruplarda ise değerler kontrol seviyesinde kalmıştır.

Yine bahsedilen çalışmalara benzer şekilde bizim çalışmamızda da Kc dokusunda; lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA düzeylerinde, kontrol grubuna göre; MTX grubunda ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde

artış gözlenmekte iken MTX grubuna göre; tedavi gruplarında özellikle de MTX+ALA grubunda ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma sözkonusu bu da demek oluyor ki Kc dokusunda; MTX'in yarattığı doku hasarıyla birlikte eklenen tedavilerin özellikle de ALA'nın oksidatif hasara karşı anlamlı şekilde koruyucu olduğunu gösteriyor. Böbrek dokusundaki MDA düzeylerinde, kontrol grubuna göre; MTX grubunda ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artma saptanırken, hasarlı gruba göre tedavi gruplarından MTX+PTX grubunda ($p=0,003$) istatistiksel olarak anlamlı, MTX+ALA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalma saptandı. Böbrek dokusunda yükselen MDA düzeylerini PTX'in daha etkili şekilde azalttığını görüyoruz.

Yüksek reaktif oksidan kapasiteye sahip bir bileşen olan NO düzeylerinde ise, kontrol grubuna göre; MTX grubunda ($p=0,009$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış gözlenmekte iken, MTX grubuna göre; tedavi gruplarında özellikle de MTX+ALA grubunda ($p=0,017$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gözlemlendi. Böylece Kc dokusunda; MTX'in oksidatif hasarına, eklenen tedavilerin özellikle de ALA'nın anlamlı şekilde koruyucu olduğu ortaya çıkar. NO düzeylerinde ise, kontrol grubuna göre; MTX grubunda anlamlı olmayan düzeyde artma varken hasarlı gruba göre tedavi gruplarında özellikle MTX+ALA grubunda anlamlı olmasa da azalma saptandı. Böbrek dokusunda yükselen NO düzeylerini ALA'nın daha etkili şekilde azalttığını görüyoruz.

Dokuya lökosit invazyonunun bir göstergesi olan MPO enzim aktivitesinde ise kontrol grubuna göre; MTX grubunda ($p=0,025$) anlamlı düzeyde artma saptanırken, MTX grubuna göre; tedavi gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma gözlenmiştir. Bu da MTX'in KC oksidatif hasarına karşı PTX ve ALA'nın istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir koruyuculuğunun olduğundan bahsedebiliriz. Böbrek dokusunda ise kontrol grubuna göre; diğer gruplarda istatistiksel olarak anlamlı azalma saptanırken; en fazla azalma MTX+ALA ($p=0,001$) grubunda, en az azalma MTX+PTX ($p=0,001$) grubundaydı. MTX grubuna göre; MTX+ALA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde azalma varken, MTX+PTX grubunda artış sözkonusuydu. Hasarlı grupta MPO aktivitesini kontrolden yüksek beklerken düşük sonuçlar geldi fakat hasarlı gruba göre

MTX+ALA grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalmanın olması ALA'nın tedavi etkinliğinin olduğunu gösterir.

Ratlarda MTX aracılı hasarlı karaciğer ve böbrek modellerinde XO çalışmasına rastlamadık fakat bizim çalışmanın sonuçları incelendiğinde; önemli serbest oksijen radikali kaynağı olan XO düzeyleri kontrol grubuna göre; MTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmayan düzeyde artış varken, MTX grubuna göre; MTX+PTX ($p=0,032$) tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma saptandı. Bu da PTX'in, MTX aracılı Kc'deki oksidatif hasara karşı antioksidan etkinliği olduğunu gösterir. Böbrek dokusunda ise, kontrol grubuna göre; MTX grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da artış olurken; hasarlı gruba göre tedavi gruplarında MTX+ALA grubu başta olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalma saptandı. Böbrek dokusunda hasarlanma ile yükselen XO aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı olmasa da ALA'nın daha etkili şekilde azalttığını görüyoruz.

Karaciğer dokusunda antioksidan enzim aktivitelerinde; kontrol grubuna göre diğer gruplarda; özellikle de MTX grubunun SOD ve CAT aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan aktivite artışı, GSH-Px aktivitesinde ise ($p=0,008$) istatistiksel olarak anlamlı aktivite artışı gözlenmekte. Yapılan bir çalışmada MTX aracılı renal hasarlanmada dokudaki SOD ve CAT enzim aktivitesinde artış gözlenmiştir (138). Özbek ve ark, SOD ve CAT enzim aktivitesinin akut faz hasarlarında arttığını görmüştür (158). Bizim çalışmanın da akut faz çalışması olduğunu düşünürsek aktivite artışını gösteren bulgular, MTX'in henüz doku hasarını gerçekleştirmediğini düşündürüyor. GSH-Px aktivitesinde tedavi grubunda daha fazla bir artış söz konusu; bu demek oluyor ki PTX ve ALA ile doku hasarına karşı MTX grubuna göre daha az etkilenmiş. Böbrek dokusunda ise; kontrol grubuna göre; SOD ve GSH-Px ($p=0,020$) enzim aktivitesinde azalma mevcut demek ki böbrek dokusu akut fazda bile MTX toksisitesinden etkilenip antioksidan enzim aktiviteleri azalmış, CAT enzim aktivitesinin artışı ise, MTX toksisitesine diğer bahsedilen iki enzimden daha dayanıklı yorumu yapılabilir. Hasarlı gruba göre; tedavi gruplarında ise SOD ve GSH-Px aktivitelerinde geriye dönüşün olması tedavinin etkili olduğunu göstermekte. Bulgularda, Kc ve böbrek dokusunda akut dönemde aktivitesi artan ortak enzim CAT'tır. Demek ki bu enzim akut dönemde

hasarda çok etkilenmemekle birlikte; SOD ve GSH-Px doku değişkenliğiyle birlikte hasara bağlı aktivite değişikliği gösterebiliyor.

Yine bahsedilen literatürleri destekler şekilde, histopatolojik olarak; MTX grubuna ait karaciğer ve böbrek dokularında, kontrol grubuna göre belirgin hasar izlenirken, tedavi gruplarında özellikle de MTX+ALA grubunda düşük düzeylerde hasar gözlemlendi. İmmünohistokimyasal olarak da; ratlarda MTX aracılı hasarlanmış karaciğer ve böbrek modelleri üzerinde PTX ya da ALA tedavisi verilen çalışmalarda iNOS ve TNF- α immünboyama yapan çalışmalara rastlamadık ancak oksidatif stresle birlikte immünboyama sonuçlarında iNOS boyanma artışı ve serumda TNF- α düzeylerinde artma sözkonusudur. Bu bulguları destekler şekilde çalışmamızın MTX ile hasarlandırılan grubunda, iNOS ve TNF- α immünboyanması yoğun iken tedavi gruplarında özellikle de MTX+ALA grubunda düşük boyanma gözlemledik. Bizim bu bulgularımız yapılan önceki çalışmaları destekler niteliktedir.

Özetle; MTX ile meydana gelen oksidatif Kc ve böbrek hasarı, ALA ile daha etkili şekilde tedavi edilmektedir. Önceki mevcut literatür bilgileri ve değerlendirmeye alınan, biyokimyasal ve histopatolojik anlamda oksidatif stres parametrelerinin sonuçlarına göre; PTX ve ALA koruyucu etkisi oksidatif stresi azaltmasına bağlı gibi gözükmektedir. Kombine grup, deney sırasında meydana gelen ölümlerden dolayı 2 rat kaldığı için değerlendirmeye alınmamıştır. İleri ki çalışmalarda daha düşük doz ile kombinasyon oluşturularak iki ilacın kombine etkisini görmek amaçlı deneyler tekrar edilebilir.

Histopatolojik değerlendirmelerde, her iki ilaç grubunda da iyileşme görölmüştür. Biyokimyasal değerlendirme; serumda KC ve böbrek fonksiyon testleri ve dokuda oksidatif parametrelerin sonuçları da bunu destekler niteliktedir.

Histopatolojik bulgular, immünboyamada iNOS ve TNF- α ile yoğun boyanma, serum BUN, üre değerlerinde anlamlı olmasa da bir artışın olması, dokuda oksidatif stresi gösteren MDA, MPO, NO'nun anlamlı düzeyde artması, XO'nun anlamlı olmayan düzeyde artması; MTX ile nefrotoksisite oluşturulduğunun kanıtıdır. Aynı şekilde histopatolojik bulgular ve immünboyamada iNOS ve TNF- α ile yoğun boyanma, serum TBil ve DBil düzeylerinde anlamlı olmasa da azalma, dokuda oksidatif stresi gösteren MDA, MPO, NO'nun anlamlı düzeyde artması,

XO'nun anlamlı olmayan düzeyde artması; MTX ile hepatotoksisitenin bir kanıtıdır. Oluşturulan bu oksidatif doku hasarları üzerine PTX tedavisi sonucunda histopatolojik bulgulara az gerileme ve immün boyamada iNOS ve TNF- α ile daha az boyanma, artan BUN ve üre değerlerinde anlamlı bir azalma, kc dokusunda; artan MDA, NO, XO düzeylerinde anlamlı, MPO düzeylerinde anlamlı olmasa da bir düşüş; PTX'in antioksidan etkinliğinin az da olsa olduğunu gösteriyor. Oluşturulan bu oksidatif doku hasarları üzerine ALA tedavisi sonucunda; histopatolojik bulgulara belirgin gerileme ve immün boyamada iNOS ve TNF- α ile daha az boyanma, artan BUN ve üre değerlerinde PTX'e göre daha anlamlı bir azalma, TBil ve DBil değerlerinde anlamlı bir artma, kc dokusunda; MDA, NO düzeylerinde PTX'e göre daha anlamlı bir düşüş, MPO düzeylerinde anlamlı olmasa da bir düşüş, böbrek dokusunda; PTX'e göre anlamlı olmasa da, SOD aktivitesinde daha fazla artış, NO düzeyinde ve XO aktivitesinde daha fazla azalma olması ALA'nın antioksidan etkinliğinin olduğu ve bu etkinin PTX'e kıyasla daha fazla olduğunu gösteriyor. Bu bağlamda PTX için daha etkili antioksidan etki yakalamak anlamında daha uzun süreli tedavi deneyleri denenebilir.

Sonuç olarak, MTX karaciğer ve böbrek hasarını oksidatif hasar ile oluşturmaktadır. PTX ve ALA ise bu hasarı antioksidan ve diğer özellikleri ile önlemektedir ve bu antioksidan özellik ALA'da daha belirgindir. Bu sonuçlara dayanılarak ileri klinik çalışmalar yapıldıktan sonra rutin kullanıma geçebilir.

ÖZET

Pentoksifilin ve Alfa Lipoik Asitin Metotreksat Aracılı Karaciğer ve Böbrek Hasarları Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Metotreksat (MTX), yaygın şekilde kemoterapötik ve antiinflamatuvar amaçlı kullanılmaktadır. Fakat karaciğer ve böbrekte oksidatif hasarlanma yaptığına dair çok sayıda çalışma vardır. Pentoksifilin (PTX), periferik vasküler ve serebrovasküler hastalıklarda doku perfüzyonu amaçlı kullanılırken; Alfa Lipoik Asit (ALA), bazı yiyeceklerde bulunan ve vücutta doğal olarak sentezlenen bir maddedir. Bu ilaçların antioksidan etkinliği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Çalışmamızda; MTX'in, sıçanların karaciğer ve böbrek dokularında meydana getirdiği yapısal değişikliklere, PTX ve ALA'nın etkilerini incelemeyi amaçladık.

48 adet 230 – 300 gr ağırlığında Sprague-Dawley erkek rat rastgele Kontrol 8, diğerleri 10 rat olmak üzere; Kontrol, MTX, MTX+PTX, MTX+ALA ve MTX+PTX+ALA olacak şekilde 5 gruba ayrıldı. Fakat deney sırasında meydana gelen rat ölümleri sonucu 5. grupta yalnızca 2 rat kalmıştır. Bundan dolayı bu grubun biyokimyasal bulguları değerlendirmeye alınmamıştır. Deneyde; ortalama hacim/gün intraperitoneal Serum Fizyolojik 20 mg/kg intraperitoneal tek doz MTX, 50 mg/kg/gün intraperitoneal 10gün PTX, 100 mg/kg/gün intraperitoneal 10 gün ALA kullanıldı. Deney sonunda karaciğer ve böbrek dokularında histokimyasal ve immünohistokimyasal incelemeler yapıldı. Serumda karaciğer ve böbrek fonksiyon testleri ve dokuda oksidatif parametreler değerlendirildi.

Histokimyasal incelemede, MTX'e bağlı oluşan hasarlanmada, tedavi gruplarında (özellikle ALA verilen grupta) belirgin azalma olduğu gözlemlendi. iNOS ve TNF- α immünboyanmasının, MTX grubunda en yoğun olduğu görülürken; tedavi gruplarında yoğunluk azalmıştır. ALA verilen grupta; artan serum BUN ve üre değerlerinde azalma, Total Bilirubin ve Direkt Bilirubin değerlerinde artma daha anlamlı görüldü. Hasarlı grupta meydana gelen Malondialdehit, Myeloperoksidaz, Nitrik Oksit düzeylerinin artışı, tedavi gruplarında düşüş göstermiştir ve bu düşüş genel anlamda ALA verilen grupta daha belirgindir. Sonuçta; MTX'in karaciğer ve böbrek dokuları üzerine olan toksik etkilerinin önlenmesinde ALA daha etkili olmakla birlikte, PTX'in de düzeltici etkilerinin olduğu sonucuna vardık.

Anahtar kelimeler: Metotreksat, Pentoksifilin, Alfa Lipoik Asit, Oksidatif doku hasarı

ABSTRACT

A Research on the Effects of Pentoxifylline and Alpha Lipoic Acid on Methotrexate Induced Liver and Kidney Damage

Methotrexate (MTX) is widely used as chemotherapeutic and antiinflammatory drug. Many studies indicate that methotrexate causes oxidative liver and kidney damage. While Pentoxifylline (PTX) is used for periferic vascular and cerebrovascular tissue perfusion, Alpha Lipoic Acid (ALA) is a substance that is included in some food and synthesized naturally. Anti-oxidant effects of these two farmosetics are indicated by many studies. The aim of this study is observing the effects of the PTX and ALA, on MTX induced liver and kidney structural changes on rats.

48 Sprague-Dawley male rats with avarage weight between 230-300 grams were divided into 5 groups: Control, MTX, MTX+PTX, MTX+ALA and MTX+PTX+ALA. For control group 8 rats and for other groups 10 rats included respectively. But as a result of the rat deaths that occurred during the experiment, 5. group has only 2 rat. Therefore, this group is not to evaluate the biochemical findings. In the experiment; average volume/day intraperitoneal saline, a single dose of 20 mg/kg intraperitoneal MTX, ten days of 50 mg/kg/day intraperitoneal PTX, ten days of 100 mg/kg/day intraperitoneal ALA are used. At the end of the experiment liver and kidney tissues were observed histochemically and immunohistochemically. Liver and kidney function tests and tissue oxidative parameters were evaluated in serum samples and tissues.

Significant decrease was observed in MTX induced damaged tissue among the treatment groups (especially ALA administered group) on histochemical observation. iNOS and TNF- α immunohistochemical density was high in MTX group, but low among the treatment groups. Decrease in increased BUN and urea serum levels and increase in the decreased Total Bilirubin and Direct Bilirubin levels were more significant in ALA administered group. Damaged occurred in Malondialdehyde, Myeloperoxidase, Nitric Oxide levels increase, the overall decline in treatment groups demonstrated and this decline is more pronounced in ALA administered group. As a result it is found that for prevention of the MTX-induced liver and kidney damage; ALA is more effective and PTX also has corrective effects.

Key words: Methotrexate, Pentoxifylline, Alpha Lipoic Acid, Oxidative tissue damage.

KAYNAKLAR

1. Widemann BC, Balis FM, Kempf-Bielack B, Bielack S, Pratt CB, Ferrari S, et al. High-dose methotrexate-induced nephrotoxicity in patients with osteosarcoma. *Cancer*. 2004 May 15;100(10):2222-32.
2. Pesce C, Mansi C, Bogliolo G, Tobia F, Pannacciulli I. Pulmonary toxicity in mice after high-dose methotrexate administration with and without leucovorin rescue. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1985 Jul;21(7):875-80.
3. Abraham P, Kolli VK, Rabi S. Melatonin attenuates methotrexate-induced oxidative stress and renal damage in rats. *Cell Biochem Funct*. 2010 Jul;28(5):426-33.
4. Jahovic N, Cevik H, Sehirli AO, Yegen BC, Sener G. Melatonin prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *Journal of pineal research*. 2003 May;34(4):282-7.
5. Kolli VK, Abraham P, Isaac B, Selvakumar D. Neutrophil infiltration and oxidative stress may play a critical role in methotrexate-induced renal damage. . *Chemotherapy*. 2009 55(2):83-90.
6. Miyazono Y, Gao F, Horie T. Oxidative stress contributes to methotrexate-induced small intestinal toxicity in rats. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2004 Nov;39(11):1119-27.
7. Caetano NN, Campello AP, Carnieri EG, Kluppel ML, Oliveira MB. Effect of methotrexate (MTX) on NAD(P)⁺ dehydrogenases of HeLa cells: malic enzyme, 2-oxoglutarate and isocitrate dehydrogenases. *Cell biochemistry and function*. 1997 Dec;15(4):259-64.
8. Regina Maria V. Babiak APC, Eva G. S. Carnieri And Ma. Benigna M. Oliveira. Methotrexate: Pentose Cycle And Oxidative Stres. *Cell Biochem Funct*. 1998;16:283-93.
9. Uraz S, Tahan V, Aygun C, Eren F, Unluguzel G, Yuksel M, et al. Role of ursodeoxycholic acid in prevention of methotrexate-induced liver toxicity. *Digestive diseases and sciences*. 2008 Apr;53(4):1071-7.
10. Hempel L, Misselwitz J, Fleck C, Kentouche K, Leder C, Appenroth D, et al. Influence of high-dose methotrexate therapy (HD-MTX) on glomerular and tubular kidney function. *Medical and pediatric oncology*. 2003 Jun;40(6):348-54.
11. Babiak RM, Campello AP, Carnieri EG, Oliveira MB. Methotrexate: pentose cycle and oxidative stress. *Cell biochemistry and function*. 1998 Dec;16(4):283-93.
12. Asvadi I, Hajipour B, Asvadi A, Asl NA, Roshangar L, Khodadadi A. Protective effect of pentoxifylline in renal toxicity after methotrexate administration. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2011 Sep;15(9):1003-9.
13. Jull AB, Arroll B, Parag V, Waters J. Pentoxifylline for treating venous leg ulcers. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012;12:CD001733.
14. Loftis LL, Meals EA, English BK. Differential effects of pentoxifylline and interleukin-10 on production of tumor necrosis factor and inducible nitric oxide synthase by murine macrophages. *The Journal of infectious diseases*. 1997 Apr;175(4):1008-11.
15. Zabel P, Schade FU, Schlaak M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. *Immunobiology*. 1993 Apr;187(3-5):447-63.

16. Trajkovic V, Badovinac V, Popadic D, Hadzic O, Stojkovic MM. Cell-specific effects of pentoxifylline on nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase mRNA expression. *Immunology*. 1997 Nov;92(3):402-6.
17. Poulakis N, Androutsos G, Kazi D, Bastas A, Provata A, Bitsakou C, et al. The differential effect of pentoxifylline on cytokine production by alveolar macrophages and its clinical implications. *Respiratory medicine*. 1999 Jan;93(1):52-7.
18. Trajkovic V. Modulation of inducible nitric oxide synthase activation by immunosuppressive drugs. *Current drug metabolism*. 2001 Sep;2(3):315-29.
19. Beshay E, Croze F, Prud'homme GJ. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram suppress macrophage activation and nitric oxide production in vitro and in vivo. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2001 Feb;98(2):272-9.
20. Noyan T, Sahin I, Sekeroglu MR, Dulger H. The serum vitamin C levels in Behcet's disease. *Yonsei medical journal*. 2003 Oct 30;44(5):771-8.
21. Perham RN. Domains, motifs, and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. *Biochemistry*. 1991 Sep 3;30(35):8501-12.
22. KARACA EG, BAYSU SÖZBİLİR N. Investigation of the Protective Role of α -Lipoic Acid on Rats Given Diethylnitrosamine. *The Medical Journal of Kocatepe*. 2007;7:11-7.
23. Suzuki YJ, Tsuchiya M, Packer L. Thiocctic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free radical research communications*. 1991;15(5):255-63.
24. Bilska A, Wlodek L. Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacological reports : PR*. 2005 Sep-Oct;57(5):570-7.
25. Odabaşoğlu F. Alfa-Lipoik Asit. *Pharma Şark*. 2001 (4):12-5.
26. Biewenga GP, Haenen GR, Bast A. The pharmacology of the antioxidant lipoic acid. *General pharmacology*. 1997 Sep;29(3):315-31.
27. Arivazhagan P, Ramanathan K, Panneerselvam C. Effect of DL-alpha-lipoic acid on the status of lipid peroxidation and antioxidants in mitochondria of aged rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2001 Jan;12(1):2-6.
28. Moini H, Packer L, Saris NE. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and applied pharmacology*. 2002 Jul 1;182(1):84-90.
29. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology A Text and Atlas*. Fourth Edition ed. USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. 532-48, 603-26 p.
30. Kayaalp O. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 12 ed. Ankara: Pelikan Yayıncılık; 2009. 328-618 p.
31. van Ede AE, Laan RF, Blom HJ, De Abreu RA, van de Putte LB. Methotrexate in rheumatoid arthritis: an update with focus on mechanisms involved in toxicity. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1998 Apr;27(5):277-92.
32. Rubino FM. Separation methods for methotrexate, its structural analogues and metabolites. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*. 2001 Nov 25;764(1-2):217-54.

33. Chabner BA, Allegra CJ, Curt GA, Clendeninn NJ, Baram J, Koizumi S, et al. Polyglutamation of methotrexate. Is methotrexate a prodrug? The Journal of clinical investigation. 1985 Sep;76(3):907-12.
34. Madhyastha S, Somayaji SN, Rao MS, Nalini K, Bairy KL. Hippocampal brain amines in methotrexate-induced learning and memory deficit. Canadian journal of physiology and pharmacology. 2002 Nov;80(11):1076-84.
35. Kishi T, Tanaka Y, Ueda K. Evidence for hypomethylation in two children with acute lymphoblastic leukemia and leukoencephalopathy. Cancer. 2000 Aug 15;89(4):925-31.
36. Cronstein BN. Molecular therapeutics. Methotrexate and its mechanism of action. Arthritis and rheumatism. 1996 Dec;39(12):1951-60.
37. Gibson LE, Perry HO. Papulosquamous eruption and exfoliative dermatitis. Philadelphia: Third edition. Moschella SL, Hurley HJ(eds) WB Saunders,; 1992. 607-22 p.
38. Kane D, Gogarty M, O'Leary J, Silva I, Bermingham N, Bresnihan B, et al. Reduction of synovial sublining layer inflammation and proinflammatory cytokine expression in psoriatic arthritis treated with methotrexate. Arthritis and rheumatism. 2004 Oct;50(10):3286-95.
39. Cronstein BN. The mechanism of action of methotrexate. Rheumatic diseases clinics of North America. 1997 Nov;23(4):739-55.
40. Chang DM, Weinblatt ME, Schur PH. The effects of methotrexate on interleukin 1 in patients with rheumatoid arthritis. The Journal of rheumatology. 1992 Nov;19(11):1678-82.
41. Seitz M, Zwicker M, Loetscher P. Effects of methotrexate on differentiation of monocytes and production of cytokine inhibitors by monocytes. Arthritis and rheumatism. 1998 Nov;41(11):2032-8.
42. Kimura E, Nishimura K, Sakata K, Oga S, Kashiwagi K, Igarashi K. Methotrexate differentially affects growth of suspension and adherent cells. The international journal of biochemistry & cell biology. 2004 May;36(5):814-25.
43. Baggott JE, Morgan SL, Ha TS, Alarcon GS, Koopman WJ, Krumdieck CL. Antifolates in rheumatoid arthritis: a hypothetical mechanism of action. Clinical and experimental rheumatology. 1993 Mar-Apr;11 Suppl 8:S101-5.
44. Chladek J, Martinkova J, Sispera L. An in vitro study on methotrexate hydroxylation in rat and human liver. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca. 1997;46(5):371-9.
45. Quemeneur L, Gerland LM, Flacher M, Ffrench M, Revillard JP, Genestier L. Differential control of cell cycle, proliferation, and survival of primary T lymphocytes by purine and pyrimidine nucleotides. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2003 May 15;170(10):4986-95.
46. Oktem F, Yilmaz HR, Ozguner F, Olgar S, Ayata A, Uzare E, et al. Methotrexate-induced renal oxidative stress in rats: the role of a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. Toxicology and industrial health. 2006 Jul;22(6):241-7.
47. Norris RE, Adamson PC. Clinical potency of methotrexate, aminopterin, talotrexin and pemetrexed in childhood leukemias. Cancer chemotherapy and pharmacology. 2010 May;65(6):1125-30.

48. Goodman, Gillmann. Tedavinin Farmakolojik Temeli. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2009. 1315- 405 p.
49. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA. The pharmacology and clinical use of methotrexate. The New England journal of medicine. 1983 Nov 3;309(18):1094-104.
50. Giannini EH, Brewer EJ, Kuzmina N, Shaikov A, Maximov A, Vorontsov I, et al. Methotrexate in resistant juvenile rheumatoid arthritis. Results of the U.S.A.-U.S.S.R. double-blind, placebo-controlled trial. The Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group and The Cooperative Children's Study Group. The New England journal of medicine. 1992 Apr 16;326(16):1043-9.
51. Hedman J, Seideman P, Albertioni F, Stenius-Aarniala B. Controlled trial of methotrexate in patients with severe chronic asthma. European journal of clinical pharmacology. 1996;49(5):347-9.
52. Tenekeci HÖ, Baflak PY, Baysal V, Karahan N. Metotreksat tedavisine yanıt veren vulvokrural yerlesimli bir Hailey-Hailey olgusu. TÜRKDERM. 2005;39:208-10.
53. Maeda T, Miyazono Y, Ito K, Hamada K, Sekine S, Horie T. Oxidative stress and enhanced paracellular permeability in the small intestine of methotrexate-treated rats. Cancer chemotherapy and pharmacology. 2010 May;65(6):1117-23.
54. Bertram GK. Basic and Clinical Pharmacology. 9 ed. Singapore: The McGraw-Hill Companies; 2004. p. 898-931.
55. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 11 ed: Ankara Hacettepe Tıp Fakültesi; 2005. 317-47 p.
56. Ohosone Y, Okano Y, Kameda H, Hama N, Matsumura M, Nojima T, et al. [Toxicity of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis--clinical characteristics in patients with MTX-induced pancytopenia and interstitial pneumonitis]. Ryumachi [Rheumatism]. 1997 Feb;37(1):16-23.
57. Kremer JM, Galivan J, Streckfuss A, Kamen B. Methotrexate metabolism analysis in blood and liver of rheumatoid arthritis patients. Association with hepatic folate deficiency and formation of polyglutamates. Arthritis and rheumatism. 1986 Jul;29(7):832-5.
58. Bleyer WA. Neurologic sequelae of methotrexate and ionizing radiation: a new classification. Cancer treatment reports. 1981;65 Suppl 1:89-98.
59. Vezmar S, Becker A, Bode U, Jaehde U. Biochemical and clinical aspects of methotrexate neurotoxicity. Chemotherapy. 2003 May;49(1-2):92-104.
60. Pınarbaşı A, Akman A, Yılmaz E, Başaran E. Metotreksat Verilen Psöriazis Vulgaris Hastalarına Folik Asit Desteği Gerekli mi? . Türk Dermatoloji Dergisi. 2008;2:39-42.
61. Nadir I, Sencan M, . Düşük Doz Metotreksat'a Bağlı Pansitopeni Gelisen Romatoid Artrit Olgusu. C Ü Tıp Fakültesi Dergisi. 2002; 24 (2):81 - 2.
62. Göğüs F. Metotreksat ve Osteopati. Romatizma. 2001;1(16):52-7.
63. Braun J, Rau R. An update on methotrexate. Current opinion in rheumatology. 2009 May;21(3):216-23.
64. West SG. Methotrexate hepatotoxicity. Rheumatic diseases clinics of North America. 1997;23:883-915.
65. Kevat S, Ahern M, Hall P. Hepatotoxicity of methotrexate in rheumatic diseases. Medical toxicology and adverse drug experience. 1988 May-Jun;3(3):197-208.

66. Kamen BA, Nylen PA, Camitta BM, Bertino JR. Methotrexate accumulation and folate depletion in cells as a possible mechanism of chronic toxicity to the drug. *British journal of haematology*. 1981 Nov;49(3):355-60.
67. Dalaklioglu S, Genc GE, Aksoy NH, Akcit F, Gumuslu S. Resveratrol ameliorates methotrexate-induced hepatotoxicity in rats via inhibition of lipid peroxidation. *Human & experimental toxicology*. 2013 Jun;32(6):662-71.
68. Kocaman N, Çolakoğlu N. Tekrarlayan Dozlarda Metotreksat Uygulamasının Sıçan Karaciğer Dokusu Üzerine Etkileri. *Fırat Tıp Dergisi*. 2013;18(3):141-5.
69. Izzedine H, Launay-Vacher V, Karie S, Caramella C, de Person F, Deray G. Is low-dose methotrexate nephrotoxic? Case report and review of the literature. *Clinical nephrology*. 2005 Oct;64(4):315-9.
70. Ahmad S, Shen FH, Bleyer WA. Methotrexate-induced renal failure and ineffectiveness of peritoneal dialysis. *Archives of internal medicine*. 1978 Jul;138(7):1146-7.
71. Seideman P, Muller-Suur R. Renal effects of aspirin and low dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1993 Aug;52(8):613-5.
72. Neuman MG, Cameron RG, Haber JA, Katz GG, Malkiewicz IM, Shear NH. Inducers of cytochrome P450 2E1 enhance methotrexate-induced hepatocytotoxicity. *Clinical biochemistry*. 1999 Oct;32(7):519-36.
73. Kroger H, Hauschild A, Ohde M, Bache K, Voigt WP, Thefeldt W, et al. Nicotinamide and methionine reduce the liver toxic effect of methotrexate. *General pharmacology*. 1999 Aug;33(2):203-6.
74. Nasiri-Toosi Z, Dashti-Khavidaki S, Khalili H, Lessan-Pezeshki M. A review of the potential protective effects of pentoxifylline against drug-induced nephrotoxicity. *European journal of clinical pharmacology*. 2013 May;69(5):1057-73.
75. Cosyns JP. Aristolochic acid and 'Chinese herbs nephropathy': a review of the evidence to date. *Drug safety : an international journal of medical toxicology and drug experience*. 2003;26(1):33-48.
76. Silva FG. Chemical-induced nephropathy: a review of the renal tubulointerstitial lesions in humans. *Toxicologic pathology*. 2004 Jul-Aug;32 Suppl 2:71-84.
77. Choudhury D, Ahmed Z. Drug-associated renal dysfunction and injury. *Nature clinical practice Nephrology*. 2006 Feb;2(2):80-91.
78. Rossert J. Drug-induced acute interstitial nephritis. *Kidney international*. 2001 Aug;60(2):804-17.
79. Gonlusen G, Akgun H, Ertan A, Olivero J, Truong LD. Renal failure and nephrocalcinosis associated with oral sodium phosphate bowel cleansing: clinical patterns and renal biopsy findings. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2006 Jan;130(1):101-6.
80. Brix AE. Renal papillary necrosis. *Toxicologic pathology*. 2002 Nov-Dec;30(6):672-4.
81. Maher P, Schubert D. Signaling by reactive oxygen species in the nervous system. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2000 Aug;57(8-9):1287-305.
82. Gutteridge J, Halliwell B. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd Ed ed. Oxford: Clarendon Press; 1991. 1-276 p.
83. Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs*. 1991 Oct;42(4):569-605.

84. Boyunaga H, Çelik C. Serbest radikaller ve hücresel denge. Bilim Teknik Dergisi. 1996;347:98-100.
85. Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. Cardiovascular diabetology. 2005;4(1):5.
86. Altuntaş A, Sezer MT. Sıçanlarda Deneysel Amfoterisin B Nefrotoksisitesinde Oksidatif Stresin Rolünün Ve Olası Oksidatif Stres Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester'in Etkisinin Araştırılması. Isparta: T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi; 2008. 9 p.
87. Fedakar Ö, Öncü M. Karnozin Ve Melatoninin Asetaminofen Aracılı Akut Karaciğer Toksisitesi Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2010. 15 p.
88. Gürdal F, Ademoğlu E. Biyokimya: Nobel Kitap Evi; 2005. 746-47 p.
89. de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. Free radical biology & medicine. 1999 Jan;26(1-2):202-26.
90. Gümüştas MK, Atukeren P. Türkiye'de sık karşılaşılan psikiyatrik hastalıklar sempozyum dizisi No:62 Oksidatif ve Nitrozatif Stresin Psikiyatrik Bozukluklarla İlişkisi Mart 2008. p. 329-40.
91. Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. Gastroenterology. 1984 Dec;87(6):1344-50.
92. Laskin DL, Rodriguez del Valle M, Heck DE, Hwang SM, Ohnishi ST, Durham SK, et al. Hepatic nitric oxide production following acute endotoxemia in rats is mediated by increased inducible nitric oxide synthase gene expression. Hepatology (Baltimore, Md). 1995 Jul;22(1):223-34.
93. Beckman JS, Carson M, Smith CD, Koppenol WH. ALS, SOD and peroxynitrite. Nature. 1993 Aug 12;364(6438):584.
94. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. Biochimica et biophysica acta. 1999 May 5;1411(2-3):385-400.
95. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular and cellular biochemistry. 2004 Nov;266(1-2):37-56.
96. Uz E, Oktem F, Yilmaz HR, Uzar E, Ozguner F. The activities of purine-catabolizing enzymes and the level of nitric oxide in rat kidneys subjected to methotrexate: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. Molecular and cellular biochemistry. 2005 Sep;277(1-2):165-70.
97. Jahovic N, Sener G, Cevik H, Ersoy Y, Arbak S, Yegen BC. Amelioration of methotrexate-induced enteritis by melatonin in rats. Cell biochemistry and function. 2004 May-Jun;22(3):169-78.
98. Devrim E, Cetin R, Kilicoglu B, Erguder BI, Avci A, Durak I. Methotrexate causes oxidative stress in rat kidney tissues. Renal failure. 2005;27(6):771-3.
99. Miketova P, Kaemingk K, Hockenberry M, Pasvogel A, Hutter J, Krull K, et al. Oxidative changes in cerebral spinal fluid phosphatidylcholine during treatment for acute lymphoblastic leukemia. Biological research for nursing. 2005 Jan;6(3):187-95.

100. Sztrymf B, Rabiller A, Nunes H, Savale L, Lebrec D, Le Pape A, et al. Prevention of hepatopulmonary syndrome and hyperdynamic state by pentoxifylline in cirrhotic rats. *The European respiratory journal*. 2004 May;23(5):752-8.
101. Krakauer T. Induction of CC chemokines in human peripheral blood mononuclear cells by staphylococcal exotoxins and its prevention by pentoxifylline. *Journal of leukocyte biology*. 1999 Jul;66(1):158-64.
102. Neuner P, Klosner G, Pourmojib M, Knobler R, Schwarz T. Pentoxifylline in vivo and in vitro down-regulates the expression of the intercellular adhesion molecule-1 in monocytes. *Immunology*. 1997 Mar;90(3):435-9.
103. Krakauer T. Pentoxifylline inhibits ICAM-1 expression and chemokine production induced by proinflammatory cytokines in human pulmonary epithelial cells. *Immunopharmacology*. 2000 Mar;46(3):253-61.
104. D'Hellencourt CL, Diaw L, Cornillet P, Guenounou M. Differential regulation of TNF alpha, IL-1 beta, IL-6, IL-8, TNF beta, and IL-10 by pentoxifylline. *International journal of immunopharmacology*. 1996 Dec;18(12):739-48.
105. Fantin M, Quintieri L, Kusz E, Kis E, Glavinas H, Floreani M, et al. Pentoxifylline and its major oxidative metabolites exhibit different pharmacological properties. *European journal of pharmacology*. 2006 Mar 27;535(1-3):301-9.
106. Yada-Langui MM, Anjos-Valotta EA, Sannomiya P, Rocha e Silva M, Coimbra R. Resuscitation affects microcirculatory polymorphonuclear leukocyte behavior after hemorrhagic shock: role of hypertonic saline and pentoxifylline. *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)*. 2004 Jul;229(7):684-93.
107. Yasuno R, Wada H. The biosynthetic pathway for lipoic acid is present in plastids and mitochondria in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*. 2002 Apr 24;517(1-3):110-4.
108. Karaca EG. Lipoik Asit: Evrensel Antioksidan. *Afyon Kocatepe University Journal of Science* 8(1):243-58.
109. Handelman GJ, al. e. *Biochem Pharmacol*. 1994;47:1725-30.
110. Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free radical biology & medicine*. 1995 Aug;19(2):227-50.
111. Bustamante J, Lodge JK, Marcocci L, Tritschler HJ, Packer L, Rihn BH. Alpha-lipoic acid in liver metabolism and disease. *Free radical biology & medicine*. 1998 Apr;24(6):1023-39.
112. Bullock MW, Brockmann JA, Patterson EL, Pierce JV, Macchi ME. Proposed structures for protogen-A and protogen. *BJ Am Chem Soc*. 1954;76:1827-8.
113. Cremer DR, Rabeler R, Roberts A, Lynch B. Safety evaluation of α -lipoic acid (ALA). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2006;46(1):29-41.
114. Teichert J, Hermann R, Ruus P, Preiss R. Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. *Journal of clinical pharmacology*. 2003 Nov;43(11):1257-67.
115. Ersoy E, Bayşu N. *Biyokimya*. Ankara: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları; 1986. 454 p.
116. Gözükar EM, Malatya, . *Biyokimya*. Malatya: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları; 1989. 55, 6, 705, 845-8 p.

117. Perricone N, Nagy K, Horvath F, Dajko G, Uray I, Zs -Nagy I. Alpha lipoic acid (ALA) protects proteins against the hydroxyl free radical-induced alterations: rationale for its geriatric topical application. *Archives of gerontology and geriatrics*. 1999 Jul-Aug;29(1):45-56.
118. Cakatay U, Kayali R, Sivas A, Tekeli F. Prooxidant activities of alpha-lipoic acid on oxidative protein damage in the aging rat heart muscle. *Archives of gerontology and geriatrics*. 2005 May-Jun;40(3):231-40.
119. Pande M, Flora SJ. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of alpha-lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology*. 2002 Aug 15;177(2-3):187-96.
120. Sattar N, Scott HR, McMillan DC, Talwar D, O'Reilly DS, Fell GS. Acute-phase reactants and plasma trace element concentrations in non-small cell lung cancer patients and controls. *Nutrition and cancer*. 1997;28(3):308-12.
121. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951 Nov;193(1):265-75.
122. Wei H, Frenkel K. In vivo formation of oxidized DNA bases in tumor promoter-treated mouse skin. *Cancer research*. 1991 Aug 15;51(16):4443-9.
123. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in enzymology*. 1990;186:421-31.
124. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clinical chemistry*. 1990 Aug;36(8 Pt 1):1440-3.
125. Güleç M, Yılmaz HR, Iraz M, Ağlamış S, Söğüt S. Sisplatin nefrotoksitesi oluşturulan sıçanların plazma glutatyon peroksidaz, süperoksid dismutaz, adenosin deaminaz aktiviteleri ve nitrik oksit seviyelerine ginkgo biloba ekstraktının etkileri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2004;24:585-91.
126. Prajda N, Weber G. Malignant transformation-linked imbalance: decreased xanthine oxidase activity in hepatomas. *FEBS letters*. 1975 Nov 15;59(2):245-9.
127. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine*. 1967 Jul;70(1):158-69.
128. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*. 1988 Mar;34(3):497-500.
129. Abdel-Wahhab MA, Nada SA, Arbid MS. Ochratoxicosis: prevention of developmental toxicity by L-methionine in rats. *Journal of applied toxicology : JAT*. 1999 Jan-Feb;19(1):7-12.
130. McNaughton L, Puttagunta L, Martinez-Cuesta MA, Kneteman N, Mayers I, Moqbel R, et al. Distribution of nitric oxide synthase in normal and cirrhotic human liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Dec 24;99(26):17161-6.
131. Muralikrishnan G, Amalan Stanley V, Sadasivan Pillai K. Dual role of vitamin C on lipid profile and combined application of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil treatment in fibrosarcoma-bearing rats. *Cancer letters*. 2001 Aug 28;169(2):115-20.

132. Demiryilmaz I, Sener E, Cetin N, Altuner D, Suleyman B, Albayrak F, et al. Biochemically and histopathologically comparative review of thiamine's and thiamine pyrophosphate's oxidative stress effects generated with methotrexate in rat liver. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. 2012 Dec;18(12):BR475-81.
133. Kose E, Sapmaz HI, Sarihan E, Vardi N, Turkoz Y, Ekinici N. Beneficial effects of montelukast against methotrexate-induced liver toxicity: a biochemical and histological study. *TheScientificWorldJournal*. 2012;2012:987508.
134. Tunali-Akbay T, Sehirli O, Ercan F, Sener G. Resveratrol protects against methotrexate-induced hepatic injury in rats. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Societe canadienne des sciences pharmaceutiques*. 2010;13(2):303-10.
135. Hemeida RA, Mohafez OM. Curcumin attenuates methotrexate-induced hepatic oxidative damage in rats. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2008 Jun;20(2):141-8.
136. Cetin A, Kaynar L, Kocyigit I, Hacioglu SK, Saraymen R, Ozturk A, et al. Role of grape seed extract on methotrexate induced oxidative stress in rat liver. *The American journal of Chinese medicine*. 2008;36(5):861-72.
137. Vardi N, Parlakpinar H, Cetin A, Erdogan A, Cetin Ozturk I. Protective effect of beta-carotene on methotrexate-induced oxidative liver damage. *Toxicologic pathology*. 2010 Jun;38(4):592-7.
138. Cetinkaya A, Kurutas EB, Bulbuloglu E, Kantarceken B. The effects of N-acetylcysteine on methotrexate-induced oxidative renal damage in rats. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2007 Jan;22(1):284-5.
139. Mohammed NA, Abd El-Aleem S, Appleton I, Maklout MM, Said M, McMahon RF. Expression of nitric oxide synthase isoforms in human liver cirrhosis. *The Journal of pathology*. 2003 Aug;200(5):647-55.
140. Hsu CM, Wang JS, Liu CH, Chen LW. Kupffer cells protect liver from ischemia-reperfusion injury by an inducible nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Shock (Augusta, Ga)*. 2002 Apr;17(4):280-5.
141. Zhu W, Fung PC. The roles played by crucial free radicals like lipid free radicals, nitric oxide, and enzymes NOS and NADPH in CCl(4)-induced acute liver injury of mice. *Free radical biology & medicine*. 2000 Nov 1;29(9):870-80.
142. Dogru-Abbasoglu ve ark., 5 (2004) Ek sayı 27–32. Aminoguanidin ve N-asetilsisteinin Endotoksemik sirozlu sıçanlarda karaciger hasarı, oksidatif ve nitrozatif stres üzerine etkisi. *The Medical Journal of Kocatepe*. 2004;5:Ek sayı 27-32.
143. Mayoral P, Criado M, Hidalgo F, Flores O, Arevalo MA, Eleno N, et al. Effects of chronic nitric oxide activation or inhibition on early hepatic fibrosis in rats with bile duct ligation. *Clinical science (London, England : 1979)*. 1999 Mar;96(3):297-305.
144. Akarsu E, Okçu N, Akgöz K, Kiki I, Kızıltunç A, 1999, Volume 10, No 4, Page(s) 315–318. Serum nitric oxide in liver cirrhosis and its relation to blood pressure. *The Turkish Journal of Gastroenterology*. 1999;10(4):315-8.
145. Ahn B, Han BS, Kim DJ, Oshima H. Immunohistochemical localization of inducible nitric oxide synthase and 3-nitrotyrosine in rat liver tumors induced by N-nitrosodiethylamine. *Carcinogenesis*. 1999;20(7):1337-44.

146. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Ochoa JB, Harbrecht BG, Flint SG, et al. Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Annals of surgery*. 1990 Oct;212(4):462-9; discussion 70-1.
147. Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide in liver diseases: friend, foe, or just passerby? *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2002 May;962:275-95.
148. Ozer MK, Asci H, Oncu M, Yesilot S, Savran M, Bayram D, et al. Effects of pentoxifylline on amikacin-induced nephrotoxicity in rats. *Renal failure*. 2009;31(2):134-9.
149. Shifow AA, Naidu MU, Kumar KV, Prayag A, Ratnakar KS. Effect of pentoxifylline on cyclosporine-induced nephrotoxicity in rats. *Indian journal of experimental biology*. 2000 Apr;38(4):347-52.
150. Taye A, El-Moselhy MA, Hassan MK, Ibrahim HM, Mohammed AF. Hepatoprotective effect of pentoxifylline against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Annals of hepatology*. 2009 Oct-Dec;8(4):364-70.
151. El-Beshbishy HA, Bahashwan SA, Aly HA, Fakher HA. Abrogation of cisplatin-induced nephrotoxicity in mice by alpha lipoic acid through ameliorating oxidative stress and enhancing gene expression of antioxidant enzymes. *European journal of pharmacology*. 2011 Oct 1;668(1-2):278-84.
152. Amudha G, Josephine A, Varalakshmi P. Role of lipoic acid in reducing the oxidative stress induced by cyclosporine A. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2006 Oct;372(1-2):134-9.
153. Celik I, Cihangiroglu M, Ilhan N, Akpolat N, Akbulut HH. Protective effects of different antioxidants and amrinone on vancomycin-induced nephrotoxicity. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*. 2005 Nov;97(5):325-32.
154. Somani SM, Husain K, Whitworth C, Trammell GL, Malafa M, Rybak LP. Dose-dependent protection by lipoic acid against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats: antioxidant defense system. *Pharmacology & toxicology*. 2000 May;86(5):234-41.
155. Sudheesh NP, Ajith TA, Janardhanan KK. Hepatoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid and alpha-Tocopherol through amelioration of the mitochondrial oxidative stress in acetaminophen challenged rats. *Toxicology mechanisms and methods*. 2013 Jun;23(5):368-76.
156. Tabassum H, Parvez S, Pasha ST, Banerjee BD, Raisuddin S. Protective effect of lipoic acid against methotrexate-induced oxidative stress in liver mitochondria. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2010 Jul;48(7):1973-9.
157. Abdin AA, El-Hamid MA, El-Seoud SH, Balaha MF. Effect of pentoxifylline and/or alpha lipoic acid on experimentally induced acute pancreatitis. *European journal of pharmacology*. 2010 Sep 25;643(2-3):289-96.
158. Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Turkoz Y, Soylu A, Ilbey YO, et al. Comparison of antioxidant enzyme activity in the internal spermatic vein and brachial veins of patients with infertile varicocele. *International urology and nephrology*. 2008;40(3):679-83.